

KORRELATIONEN ZWISCHEN WACHSTUM UND MORPHOGENESE
BEI GEWEBEKULTUREN VON DAUCUS CAROTA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
der Doktorwürde

vorgelegt dem
Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von
Heide Meyer-Teuter
aus Augsburg

1972

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

KORRELATIONEN ZWISCHEN WACHSTUM UND MORPHOGENESE

BEI GEWEBEKULTUREN VON DAUCUS CAROTA

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung

der Doktorwürde

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von

Heide Meyer-Teuter

aus Augsburg



1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert

2. Referent: Prof. Dr. Th. Eckardt

Tag der Promotion: 7. 3. 1972

INHALT

	Seite
EINLEITUNG	4
MATERIAL UND METHODEN	7
ERGEBNISSE	13
I Wachstum der Karottengewebekulturen	
1. Zuwachs an Frischgewicht	
2. Trockengewichtsanteil am Frischgewicht	18
3. Zellgehalt der Kulturen	20
4. Zellteilungsaktivität	25
a. individuell beobachteter Einzelzellen	
b. ganzer Explantate	27
II Morphogenese der Karottengewebekulturen	32
1. Embryogenese	
a. Ergebnisse mikroskopischer Untersuchungen an embryobildenden Kulturen	
b. Abhängigkeit der Embryobildung von der Kulturdauer und der Temperatur	34
c. Erhaltung der Fähigkeit zur Embryogenese durch Wachstumsretardierung	36
2. Rhizogenese	45
a. Ergebnisse mikroskopischer Untersuchungen an wurzelbildenden Kulturen	
b. Abhängigkeit der Wurzelbildung von der Kulturdauer und der Temperatur	
III DNS-Gehalt der Karottengewebekulturen	48
DISKUSSION	59
ZUSAMMENFASSUNG	85
LITERATURVERZEICHNIS	88

EINLEITUNG

Schon 1902, als noch keine Möglichkeiten zur zeitlich unbegrenzten Kultivierung von Pflanzengewebe in vitro bestanden, sah HABERLANDT voraus: "... glaube ich...keine allzu kühne Prophezeiung auszusprechen, wenn ich auf die Möglichkeit hinweise, daß es ... vielleicht gelingen wird, aus vegetativen Zellen künstliche Embryonen zu züchten."

Doch erst 1939, als synthetische Wachstumsstoffe zur Verfügung standen, konnte Kallusgewebe höherer Pflanzen unbegrenzt auf chemisch definierten Medien kultiviert werden (GAUTHERET 1939; WHITE 1939a; NOBECOURT 1938). In nachfolgenden Versuchen wurde Tabak-Kallus-Gewebe auch zur Regeneration von Blattknospen (WHITE 1939b) und ganzen Sprossen mit Wurzeln (SKOOG 1944) angeregt, während LEVINE (1947) aus Karottenkalli und STEWARD et al. (1958) aus Karottensuspensionskulturen ganze Pflanzen durch Sproß- und Wurzelregenerate erhielten. Erst durch REINERT's Versuche (1958b; 1959) wurde HABERLANDT's Prognose erfüllt; aus den somatischen Zellen der Karottenkalli entwickelten sich bipolare Meristeme, die den Embryonen aus Zygoten vergleichbar sind. Diese Ergebnisse wurden in der folgenden Zeit an Karottenkulturen (WETHERELL and HALPERIN 1963; KATO and TAKEUCHI 1963; STEWARD et al. 1963; NORREEL and NITSCH 1968) und auch anderen Objekten (KOHLENBACH 1965; KONAR and NATARJA 1965; HACCIIUS and LAKSHMANAN 1965; REINERT et al. 1966; VASIL and HILDEBRANDT 1966; YAMADA, NAKAGAWA and SINOTO 1967) bestätigt. Damit haben sich pflanzliche Zellen in vitro im Gegensatz zu Zellen höherer Tiere als totipotent erwiesen. Sie stellen ein vorzügliches Arbeitsmaterial für Untersuchungen über Differenzierung und Morphogenese dar.

In vitro ist die einzelne Zelle den korrelativen Einflüssen entzogen, denen sie in der intakten Pflanze unterliegt. Dafür können durch entsprechende Änderungen des äußeren Milieus wie der chemischen Zusammensetzung des Mediums, der Kultivierungstemperatur oder der Lichtverhältnisse vielleicht Faktoren gefunden werden, die bestimmte Differenzierungen auslösen. Es ist deshalb wichtig, daß die Induktion der Embryonen durch chemisch eindeutig definierbare Medien erfolgt ohne komplexe Zusätze wie etwa dem flüssigen Endosperm der Kokosnuß (STEWART et al. 1963) oder Pflanzenpreßsäften (KOHLENBACH 1965). Es ist nämlich eindeutig erwiesen, daß embryosackähnliche Außenbedingungen (isolierte Einzelzellen in kokosnußmilchhaltigen Nährmedien), wie sie von STEWART noch 1967 als unerläßlich postuliert wurden, für die Embryogenese in vitro nicht erforderlich sind (REINERT et al. 1966; HALPERIN 1966a).

Eingehendere Untersuchungen wurden auch dem Auxingehalt sowie Form und Konzentration des Stickstoffangebotes im Medium gewidmet. HALPERIN and WETHERELL (1965a) glaubten zunächst, daß Ammoniumsalze für die Embryogenese unerläßlich seien. Es stellte sich aber heraus, daß Stickstoff auch in nicht reduzierter Form (Nitrat) die Embryogenese induzieren kann (REINERT et al. 1966; REINERT et al. 1967; TAZAWA and REINERT 1969). Eine bestimmte, für die Induktion nötige Stickstoffmenge kann nicht angegeben werden, da offensichtlich auch das Verhältnis von Auxin zu Stickstoff dabei eine Rolle spielt (REINERT und TAZAWA 1969).

Werden die Kalli über längere Zeit kultiviert, so ändern sich ihre Eigenschaften; unter anderem nimmt die Fähigkeit zur Morphogenese ab bzw. geht verloren. Auf einen Verlust

der Regenerationsfähigkeit für Sproß- und Wurzelbildung haben viele Autoren hingewiesen. (REINERT 1958a; 1968; MURASHIGE and NAKANO 1965; SYONO 1965b; GAUTHERET 1966); die Beobachtung trifft auch für die Embryogenese zu (HALPERIN and WETHERELL 1965b; REINERT 1967). Das bedeutet aber, daß man nicht über längere Zeit mit denselben Kulturen experimentieren kann. REINERT und Mitarbeiter (REINERT et al. 1968; 1970) haben das Verhalten der Gewebekulturen aus Kulturformen der Karotte bzgl. Morphogenese bis zu 33 Monaten kontinuierlich untersucht und jedesmal den Verlust der Fähigkeit zur Embryobildung nach einer bestimmten Zeit festgestellt. Weiterhin fanden sie Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Morphogeneseverlust und Wachstumsgeschwindigkeit.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, Veränderungen in Gewebekulturen, die nach längerer Züchtung in vitro auftreten, weiter zu untersuchen. Die Karottenkulturen wurden nach der Isolierung über einen Zeitraum von 5 Jahren bzgl. Embryonen- und Wurzelbildung und deren möglicher Abhängigkeit von der Zellteilungsaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet. Es wurden dazu zwei verschiedene Medien benutzt und der Einfluß infraoptimaler Temperaturen geprüft. Schließlich wurde der durchschnittliche DNS-Gehalt pro Zelle bestimmt, um Aufschlüsse über Ploidieänderungen in den Kulturen zu erhalten.

MATERIAL UND METHODEN

1. Kultivierung der Gewebe

Als Ausgangsmaterial für die Gewebekulturen dienten Rüben einer Kulturform von *Daucus carota* var. "Rote Riesen". Die Oberfläche der Rüben wurde mit 9%igem Chlorkalk sterilisiert und dann aus der Kambiumregion des oberen Rübendrittels Explantate (0,4x0,4x0,2cm) steril isoliert. Die Kultivierung der Gewebe erfolgte in Kulturröhrchen (Länge 15 cm, Durchmesser 2 cm) auf 10 ml Schrägagar bei Dunkelheit und in vierwöchigem Übertragungsrhythmus, die Temperatur betrug, wenn nicht anders angegeben, $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Zu den Versuchen wurden 6 Kulturgruppen (A-F) verschiedenen Alters (gerechnet seit der Isolierung) benutzt. Jede Kulturgruppe bestand aus 2-6 Stämmen (1 Stamm enthält Gewebe aus je 1 Rübe), jeder Stamm aus mindestens 4, höchstens 120 Explantaten (2-3 je Kulturröhrchen).

Tabelle 1: Daten zu den Kulturgruppen

Gruppe	Tag der Isolierung aus der Rübe	Anzahl der Stämme	untersucht von - bis
A	Dezember 1965	5	164.-264. Wch
B	2.11.1966	2	116.-196. "
C	4.1./6.2.1968	6	80.-160. "
D	2. 7.1968	3	72.-136. "
E	9. 1.1969	3	0.-108. "
F	10. 2.1970	4	0.- 52. "

Alle Stämme wurden vom Tag der Isolierung an auf zwei verschiedenen 0,8%igen Agar-Medien Ms und Mw kultiviert; Mw enthielt die Salze

und organischen Zusätzen nach WHITE (1954) ergänzt durch 5×10^{-2} mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Ms entsprach dem Medium nach MURASHIGE and SKOOG (1962) in der modifizierten Form von REINERT et al. (1966).

2. Bestimmung des Frischgewichtes

Von den Kulturgruppen A, B, und E wurde über einen Zeitraum von 36 bzw. 56 Wochen der Zuwachs an Frischgewicht während einer Übertragungsperiode (4 Wochen) bestimmt. Der relative Zuwachs errechnete sich aus $\frac{\text{Auswaage} - \text{Einwaage}}{\text{Einwaage}}$. Bei den frisch isolierten Explantaten betrug die Einwaage im Durchschnitt 30 mg, bei bereits länger kultivierten Geweben 300 mg.

3. Bestimmung der Zellzahl

Am Ende jeder Übertragungsperiode wurde die Zellzahl je mg Frischgewicht bestimmt. Zur Mazeration kamen 200 - 1000 mg frisches Gewebe in 10 - 20 ml 5%ige Chromsäure und für 12 - 24 Stunden auf einen Horizontalschüttler (50 U/Min) bei 28°C. Die völlige Trennung der Zellen erfolgte durch Aufsaugen und Ausstoßen der Suspension in eine Pasteurpipette (nach der Methode von BROWN and BROADBENT 1951). Der Zählung der Zellen diente eine Kammer von 0,73 ml Volumen (45,7 mm x 20,1 mm x 0,8 mm). Nach der Sedimentation der Zellen auf dem Boden der Kammer wurde eine repräsentative Teilfläche der Kammer (3 Längsstreifen, 3 Querstreifen) von $124,4 \text{ mm}^2$ mit einem Zähllokular (nach Sandkühler, Fa. Leitz) phasenkontrastmikroskopisch (Vergrößerung 12,5 x 10) ausgezählt und von jeder Probe insgesamt ein bis zwei Zählungen durchgeführt.

Nach GOLDSTEIN (1964, S.123) mußten bei jeder Bestimmung mindestens 385 Zellen gezählt werden, wenn der Fehler der Zählung 10% nicht überschreiten sollte. Denn wenn das Zählergebnis einer Probe "L" und der Standardfehler $S_L = \sqrt{L}$ (da Poisson-Verteilung vorliegt) betragen, dann liegt das 95%-Vertrauensintervall im Bereich von $L \pm 1,96 \cdot \sqrt{L}$. Daraus ergibt sich:

$$1,96 \times S_L \leq 0,1 \times L$$

$$1,96 \times \sqrt{L} \leq 0,1 \times L$$

$$19,6 \leq \frac{L}{\sqrt{L}} = \sqrt{L}$$

$$385 \leq L$$

Diese Bedingungen ließen sich durch eine entsprechende Verdünnung der Suspension erreichen. Wegen der mit wachsendem "L" zunehmenden Genauigkeit, betrug die Summe der gezählten Zellen meistens um 1000. Bei einigen Proben wurden die Zellzahlen nicht direkt ermittelt, sondern zunächst 10 Felder bestimmter Größe in der Kammer photographiert und dann die Filmnegative ausgewertet.

4. Erfassung der Regenerate

Unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen (Medien Mw bzw. Ms) bildeten die Kulturen Wurzeln bzw. Embryonen. Ein Maß für die Organogenese war der Prozentsatz derjenigen Kulturen eines Stammes, die Regenerate zeigten:

$$\% E = \frac{\text{Kulturen, die Embryonen bilden}}{\text{Gesamtzahl der Kulturen}}$$

In Zweifelsfällen erfolgte eine mikroskopische Untersuchung; als Embryonen galten nur solche Formen, die mindestens das herzförmige Stadium erreicht hatten (vgl. Abb. 12). - Vor der Übertragung auf frisches Medium wurden die Regenerate entfernt.

5. Herstellung von Trockenmaterial

Zur Ermittlung der Relation Trockengewicht / Frischgewicht und zur Gewinnung des Ausgangsmaterials für die DNS-Bestimmung wurden 2 - 10 g frisches Gewebe (wenn nicht anders angegeben am Ende einer Übertragungsperiode) mit flüssigem Stickstoff eingefroren und dann 70 - 80 Stunden lyophilisiert (Gamma M - Gefrier-trocknungsanlage, Fa. Christ). Die Aufbewahrung des pulverisier-ten Trockenmaterials bis zur Weiterverarbeitung erfolgte im Exsikkator.

6. DNS - Bestimmung

Die DNS wurde direkt vor der Kultivierung (Karotte) sowie 1, 2 und 4 Wochen nach Isolierung der Kulturen und weiterhin jeweils am Ende der 4-wöchigen Subkultivierungsperioden bestimmt. Vor der eigentlichen DNS - Extraktion waren Vorextraktionen nö-tig, um störende Substanzen zu entfernen. Für Karottengewebe-kulturen eignet sich am besten der Arbeitsgang von SMILLIE and KROTKOV (1960) modifiziert nach BEIER (1969). In jedem der in Tab. 2 angegebenen Extraktionsmedien verblieben die Proben unter Umrühren ca. 2 Minuten im Eisbad; sodann wurde nach Zentrifugie-ren (2500g, 5 Min.) jeweils der Überstand verworfen. Da bei den Trichloressigsäure-Extraktionen (TCE) die Gefahr eines DNS-Ab-baues besteht, mußte die Zentrifugation unter Kühlung erfolgen. (3900 g, 4°C). An die TCE-Extraktionen schlossen sich 2 Waschun-gen mit an Natriumacetat gesättigtem Äthanol an, um bei der nach-folgenden heißen Lipidextraktion keine DNS zu verlieren (HOLD-GATE and GOODWIN 1965; STEELE, OKAMURA and BUSCH 1964). Die Li-pidextraktion wurde in Äthanol/Diäthyläther (3:1) bei 65°C

Tab. 2: Arbeitsgang der Vorextraktion

Inhalt des zu verwerfenden Überstandes	Zentrifugation	Extraktion	
Farbstoffe, Phosphate freie Nukleotide	← 5 Min, 20°C	10ml Methanol, 4°C	100-200mg Trocken- pulver Rückstand
"	← 5 Min, 20°C	10ml Methanol, 4°C	Rückstand
restl. Farbstoffe	← 5 Min, 20°C	10ml Methanol 0,05 M an Ameisensäure, 4°C	Rückstand
"	← 5 Min, 20°C	10ml Methanol 0,05 M an Ameisensäure, 4°C	Rückstand
säurelös. Phosphate	← 10 Min, 4°C	10ml 5% TCE, 4°C, 10 Min	Rückstand
"	← 10 Min, 4°C	10ml 5% TCE, 4°C, 10 Min	Rückstand
restl. TCE	← 5 Min, 4°C	10ml 90% Äthanol, gesättigt an Na-Acetat, 4°C	Rückstand
"	← 5 Min, 4°C	10ml 90% Äthanol, gesättigt an Na-Acetat, 4°C	Rückstand
	← 5 Min, 20°C	10ml 95% Äthanol, 4°C	Rückstand
Lipide, Farbstoffe	← 5 Min, 20°C	10ml abs. Äthanol/Diäthyläther (3:1), 65°C 7 Min	Rückstand
"	← 5 Min, 20°C	10ml abs. Äthanol/Diäthyläther (3:1), 65°C 7 Min	Rückstand
"	← 5 Min, 20°C	10ml Diäthyläther, 20°C	Rückstand
"	← 5 Min, 20°C	10ml Diäthyläther, 20°C	Rückstand
	← 5 Min, 20°C		fettfreies Pulver, im Vakuummex- sikkator getrocknet

durchgeführt (WOODSTOCK and SKOOG 1960).

Die Extraktion der DNS erfolgte nach der Methode von SCHNEIDER (1945) in einer abgewandelten Form, wie sie auch HOLDGATE and GOODWIN (1965) und BEIER (1969) benutzten. Die Proben wurden dreimal mit 3 bzw. 2 ml 5%iger Perchlorsäure 20 Minuten lang bei 70°C extrahiert und anschließend der jeweilige Überstand bei 2500 g abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände (5 - 6 ml) ergaben den DNS-Extrakt.

Die DNS-Konzentration der Extrakte wurde mit Hilfe der Dische-Reaktion (DISCHE 1955) modifiziert nach BURTON (1956) bestimmt.

1 ml Extrakt wurde mit 2 ml Diphenylaminreagenz (KUPILA et al. 1961) versetzt, 18 Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend mit dem Beckman-DK-2A-Spektralphotometer die Extinktion in 1-cm-Küvetten bei 595 nm (Absorptionsmaximum des blauen Farbkomplexes der Desoxyribose mit Diphenylamin) gemessen. Als Standard für die Eichkurve und als bei allen Bestimmungen mitlaufende Kontrolle diente Lachssperma-DNS (SERVA, Entwicklungslabor Heidelberg), ebenfalls vorher 20 Minuten mit 5%iger Perchlorsäure bei 70°C hydrolysiert. Die Methode brachte reproduzierbare Ergebnisse. Der Mittelwert $\bar{x}$ von 8 parallelen Bestimmungen lag mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% im Bereich von $\bar{x} \pm 5\%$ ($\bar{x} \pm 2,58 \sqrt{\frac{s^2}{n}}$). (GOLDSTEIN, S. 46).

ERGEBNISSE

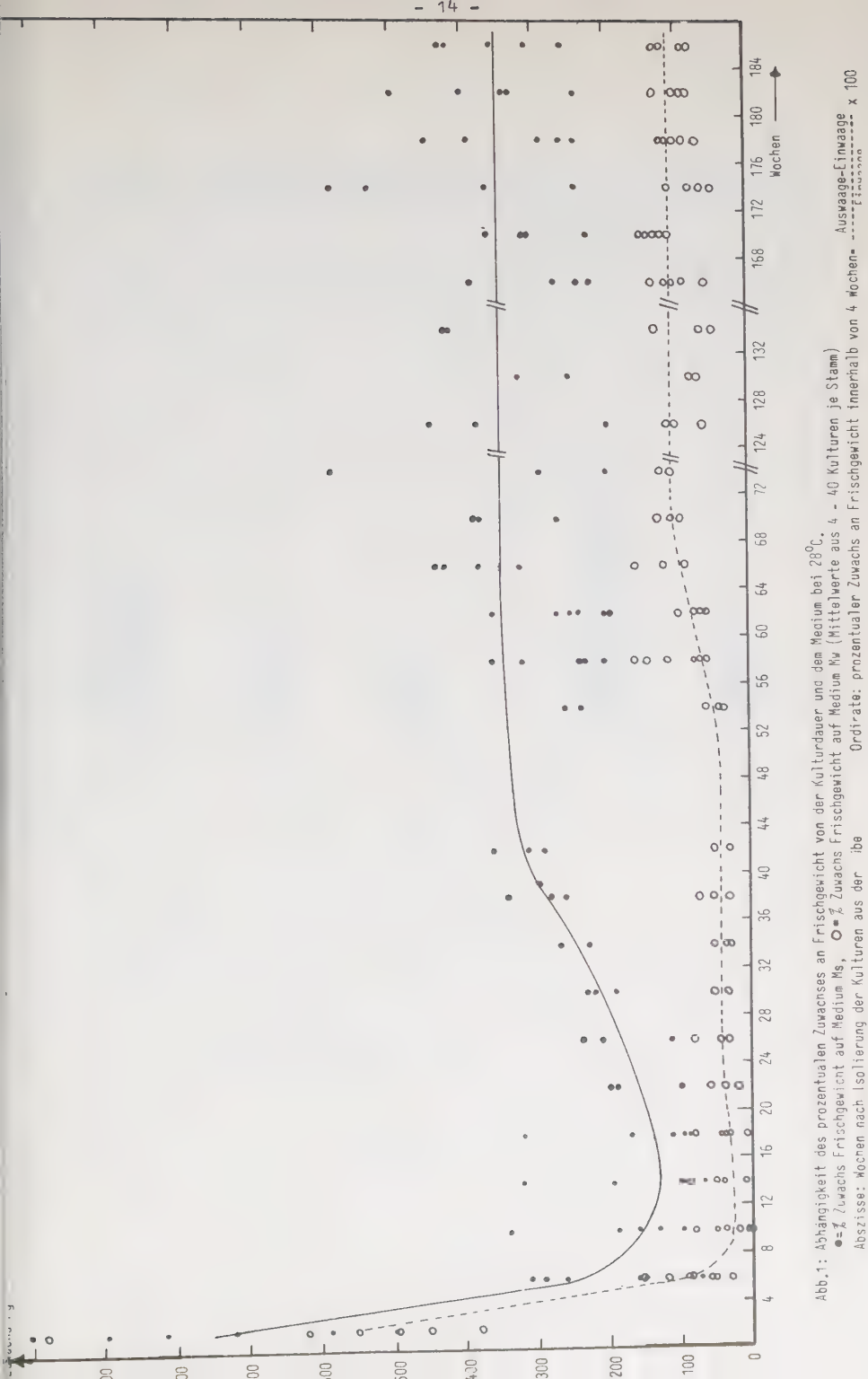
I Wachstum der Karottengewebekulturen

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Wachstum und Morphogenese feststellen zu können, mußte sowohl die Substanzzunahme (Zuwachs an Frisch- und Trockengewicht) als auch die Zellteilungsaktivität bestimmt werden, um Aussagen über Streckungs- und Teilungswachstum machen zu können.

1. Zuwachs an Frischgewicht

Der größte Zuwachs an Frischgewicht innerhalb von 4 Wochen (400-1000%) erfolgte bei 28°C sowohl auf Ms- als auch auf Mw-Medium in den ersten 4 Wochen nach der Isolierung des Gewebes aus der Rübe. Der Gesamtzuwachs der ersten 4 Wochen lag auf Mw durchschnittlich 25 % unter dem auf Ms (Abb.1); in der ersten Woche wuchsen die Kulturen allerdings auf beiden Medien gleich stark (Abb.2). Bei Ms-Kulturen sank der 4-wöchige Frischgewichtszuwachs in der Regel dann auf etwas über 100 % ab, um nach der 20. Woche langsam wieder zu steigen und nach 40 Wochen einen konstanten Wert von 350 % zu erreichen. Auf Mw-Medium wuchsen die Kulturen ab der 4. Woche nur noch um durchschnittlich 50 % je 4 Wochen. Ein Anstieg des prozentualen Zuwachses auf 110 % je 4 Wochen war aber auch bei ihnen zu registrieren, allerdings wesentlich später als bei Ms-Kulturen (zwischen der 50. und 70. Woche).

Der prozentuale Zuwachs nahm bei herabgesetzter Kultivierungstemperatur ab (Abb.3). Von 18 - 28°C ähnelten sich die Kurven des prozentualen Zuwachses - auf einem jeweils niedrigeren



Tab. 5: Prozentualer Zuwachs an Frischgewicht und 95%-Vertrauensbereiche (mittlerer Fehler $m \pm t_{5\%}$) von Karottenkulturen auf Ms und Mw bei 28°C.

Stamm	Zeitraum i. Wch	Ms		Mw	
		Zuwachs	Vertr. ber.	Zuwachs	Vertr. ber.
E I-III	0- 4	789	$\pm$ 95	528	$\pm$ 47
	4- 8	209	$\pm$ 42	56	$\pm$ 14
	8- 12	208	$\pm$ 46	24	$\pm$ 7
	12- 16	180	$\pm$ 34	59	$\pm$ 13
	16- 20	165	$\pm$ 34	50	$\pm$ 10
	20- 24	171	$\pm$ 27	41	$\pm$ 13
	24- 28	193	$\pm$ 41	54	$\pm$ 11
	28- 32	223	$\pm$ 52	40	$\pm$ 7
	32- 36	238	$\pm$ 36	37	$\pm$ 7
	36- 40	300	$\pm$ 42	55	$\pm$ 11
	40- 44	312	$\pm$ 51	52	$\pm$ 5
	64- 68	389	$\pm$ 79	111	$\pm$ 38
	68- 72	346	$\pm$ 48	120	$\pm$ 16
B 2	120- 140	378	$\pm$ 44	116	$\pm$ 17
3	120- 140	385	$\pm$ 48	100	$\pm$ 14
A 1	168- 168	304	$\pm$ 25	87	$\pm$ 6
2	60- 168	291	$\pm$ 25	91	$\pm$ 10
3	100- 168	399	$\pm$ 25	85	$\pm$ 13
4	108- 168	456	$\pm$ 34	133	$\pm$ 17
5	168- 168	288	$\pm$ 27	127	$\pm$ 15

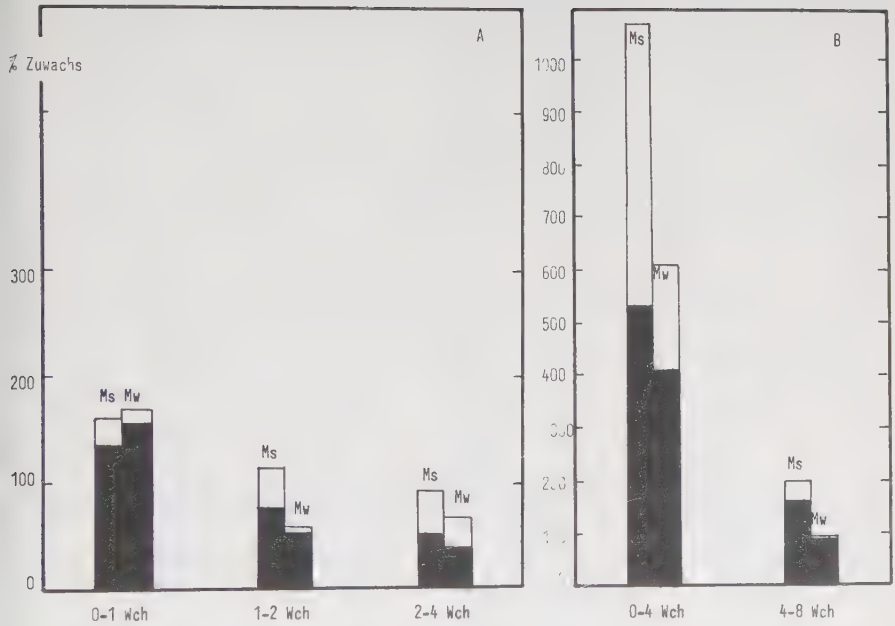


Abb. 2: Vergleich des prozentualen Zuwachses von Frisch- und Trockengewicht

□ % Zuwachs an Frischgewicht auf den Medien Ms und Mw
 ■ % Zuwachs an Trockengewicht auf den Medien Ms und Mw
 Mittelwerte von 4 Stämmen (F1-4) mit jeweils 12-38 Explantaten

Abszisse: Kulturzeitraum, in dem die Zuwachsrate bestimmt wurde

Ordinate: prozentualer Zuwachs an Frisch- bzw. Trockengewicht innerhalb von 1 bzw. 2 Wochen (A) und innerhalb von 4 Wochen (B)

$$\% \text{ Zuwachs} = \frac{\text{Auswaage} - \text{Einwaage}}{\text{Einwaage}} \times 100$$

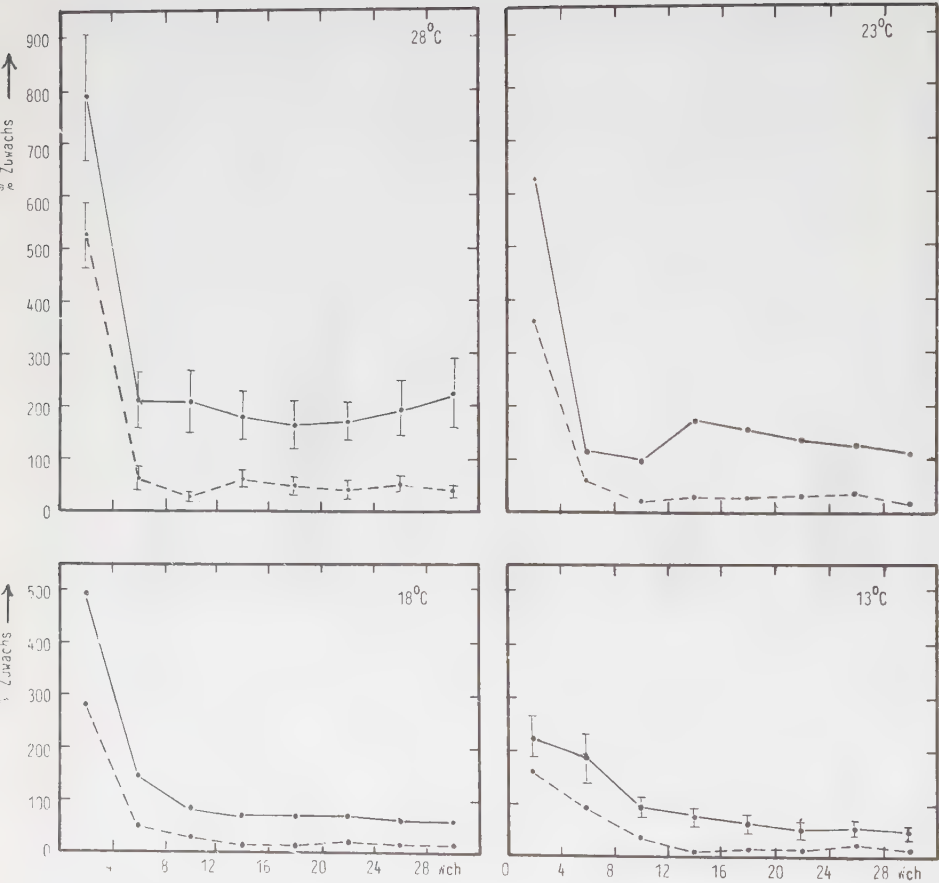


Abb.3: Abhängigkeit des prozentualen Zuwachses an Frischgewicht von der Temperatur.
Mittelwerte aus je 3 Stämmen (E1-3), pro Stamm 8-20 Explantate

— Ms
- - - Mw
I = 99%-Vertrauensbereiche

Abszisse: Kulturdauer in Wochen nach Isolierung aus der Rübe

Ordinate: prozentualer Zuwachs an Frischgewicht innerhalb von 4 Wochen (vgl. Abb.2.)

Niveau - mit den höchsten Werten zwischen der 0. und 4. Woche und späterem Absinken der Werte auf ein niedrigeres Plateau. Kulturen, die bei 13°C gehalten wurden, benötigten für die erste große Wachstumsperiode statt 4 acht Wochen. Mw-Kulturen wuchsen bei 13°C und 18°C später kaum noch; der prozentuale Zuwachs von Ms-Kulturen bei 13°C entsprach mit 50% / 4 Wochen ungefähr dem von Mw-Kulturen bei 28°C (Abb.3).

Einige Kulturen wurden auch bei 10 und 5°C gehalten. Ihre Zuwachsraten lagen aber nur wenig unter denen von 13°C-Kulturen (Ms, 16.-44. Woche untersucht).

2. Trockengewichtsanteil am Frischgewicht

Abb.4 zeigt, daß der Anteil der Trockensubstanz am Frischgewicht im Laufe der Kulturzeit abnahm, und zwar bei Ms-Kulturen schneller und insgesamt stärker als bei Mw-Kulturen. Nach 100 Wochen enthielten schließlich 100 mg frisches Gewebe 2,5 mg Trockensubstanz bei Ms-Kulturen bzw. 5,5 mg bei Mw-Kulturen gegenüber 12,5 mg in der frischen Rübe. Diese rapide Abnahme der Trockensubstanz ist gleichbedeutend mit einem zunehmenden Wassergehalt, besonders der Ms-Kulturen, in den ersten Wochen der Kultivierung. Bei einem Vergleich zwischen dem Zuwachs an Frischgewicht und dem an Trockengewicht (Abb.2) ergab sich, daß die Unterschiede im Frischgewichtszuwachs zwischen Ms- und Mw-Kulturen in den ersten 4 Wochen vorwiegend auf vermehrter Wasseraufnahme der Ms-Kulturen beruhten, während die Trockengewichtszunahmen fast gleich waren. Die

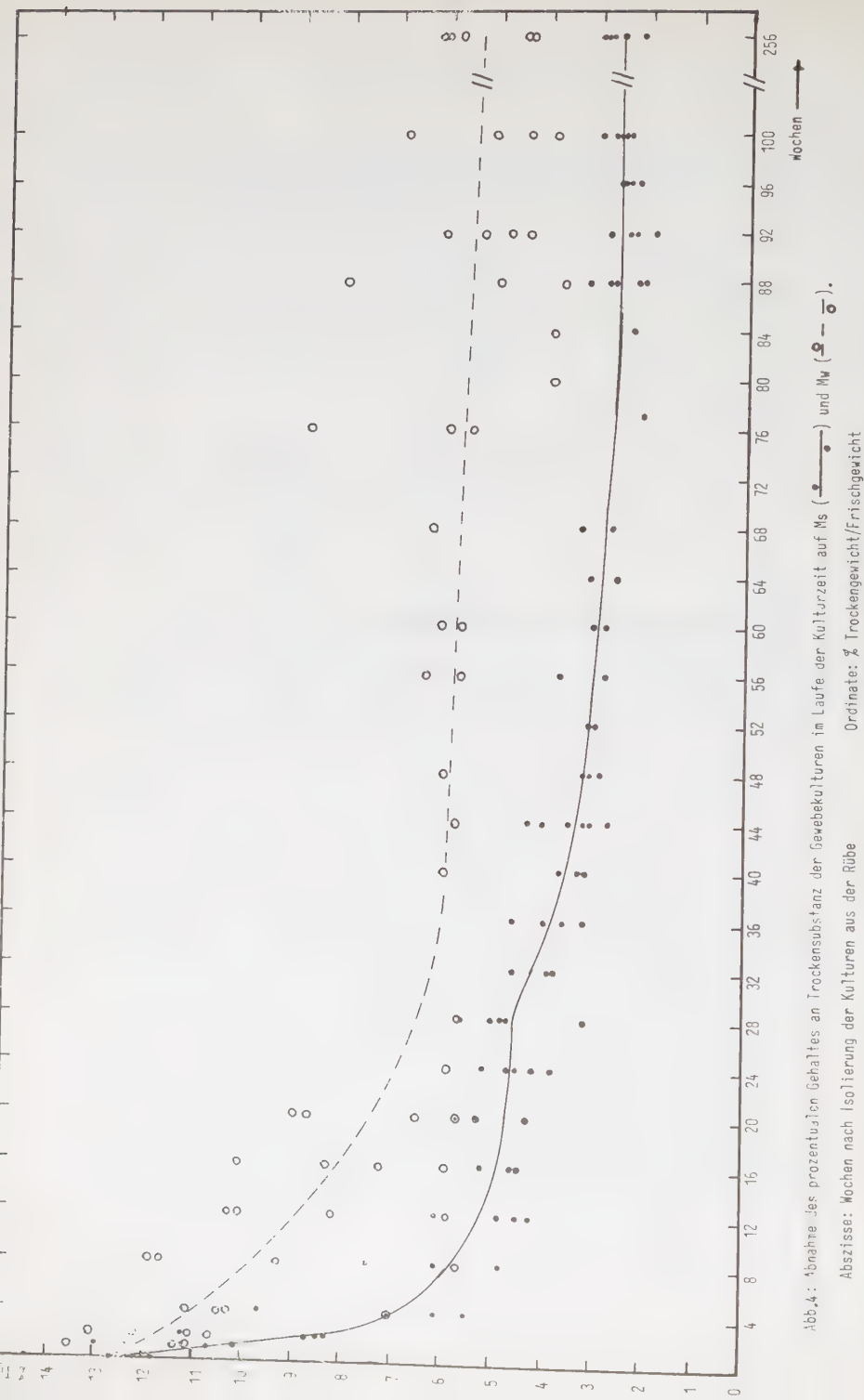


Abb. 4: Abnahme des prozentualen Gehaltes an Trockensubstanz der Gewebekulturen im Laufe der Kulturzeit auf M_s (—●—) und M_w (---○---).
 Ordinate: % Trockengewicht/Frischgewicht
 Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

Wasseraufnahme erfolgte hauptsächlich in der zweiten Hälfte der 4-wöchigen Kulturperiode (Abb.2A).

Allgemein waren prozentualer Zuwachs an Frischgewicht und Gehalt an Trockensubstanz negativ korreliert, wenn man die beiden Meßgrößen verschiedener Stämme oder von Kulturen auf verschiedenen Medien zueinander in Beziehung setzte (Abb.5).

3. Zellgehalt der Kulturen

Um Aufschluß über die quantitativ/qualitative Zellzusammensetzung und deren Veränderungen in Abhängigkeit vom Medium, der Kultivierungsdauer und der Temperatur zu erhalten, und auch um Anhaltspunkte für das Teilungswachstum zu gewinnen, wurde die Anzahl der Zellen pro Frischgewichtseinheit bestimmt. Das Ausgangsmaterial (die Rüben) war sehr heterogen; pro mg Frischgewicht enthielten die Rüben zwischen 11000 und 23000 Zellen. Oft lag der Wert aber im Bereich von 11000 bis 14000 Zellen/mg Frischgewicht. Aus der Zellzusammensetzung der Rüben konnten aber keine Voraussagen über die künftige Entwicklung der Kulturen gewonnen werden; sie verlief unabhängig davon, aber ebenfalls unterschiedlich bei den einzelnen Stämmen.

In den ersten 4 Wochen nahm bei Ms-Kulturen die Zellzahl/mg Frischgewicht entweder auf ca. 5000 ab (Stämme F1 und F2, Abb.6), oder aber sie stieg nach einer oder zwei Wochen auf fast 30000 an (Stämme F3 und F4, Abb.6). Da aus der Zellzahl/mg Frischgewicht auch Rückschlüsse auf die Zellgröße geschlossen werden können, lagen also bei F1 und F2 nach 4 Wochen große parenchymatische Zellen vor, bei F3 und F4 dagegen mehr kleine embryonale. Spätestens

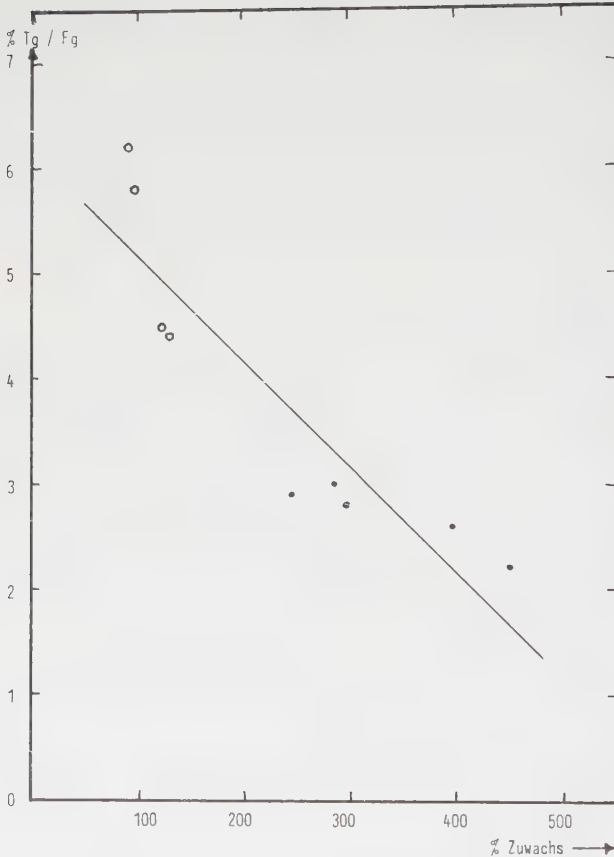


Abb. 5: Abnahme des prozentualen Anteils von Trockensubstanz am Frischgewicht mit zunehmendem prozentualen Zuwachs an Frischgewicht bei Ms- und Mw-Kulturen von den Stämmen A 1-5.

● = % $\frac{Tg}{Fg}$ eines Stammes auf Ms (Mittelwert von 18-22 Kulturen)

○ = " " eines Stammes auf Mw (Mittelwert von 14-23 Kulturen)

Regressionsgerade: $y = -0,01x + 6,1$

Korrelationskoeffizient: $r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}][\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}]}} = -0,9$ (GOLDSTEIN 1964)

Die negative Korrelation ist signifikant nach dem t-Test ($p < 0,01$)

Abzisse: prozentualer Zuwachs an Frischgewicht innerhalb von 4 Wochen, vgl. Abb. 1

Ordinate: prozentualer Anteil von Trockengewicht am Frischgewicht

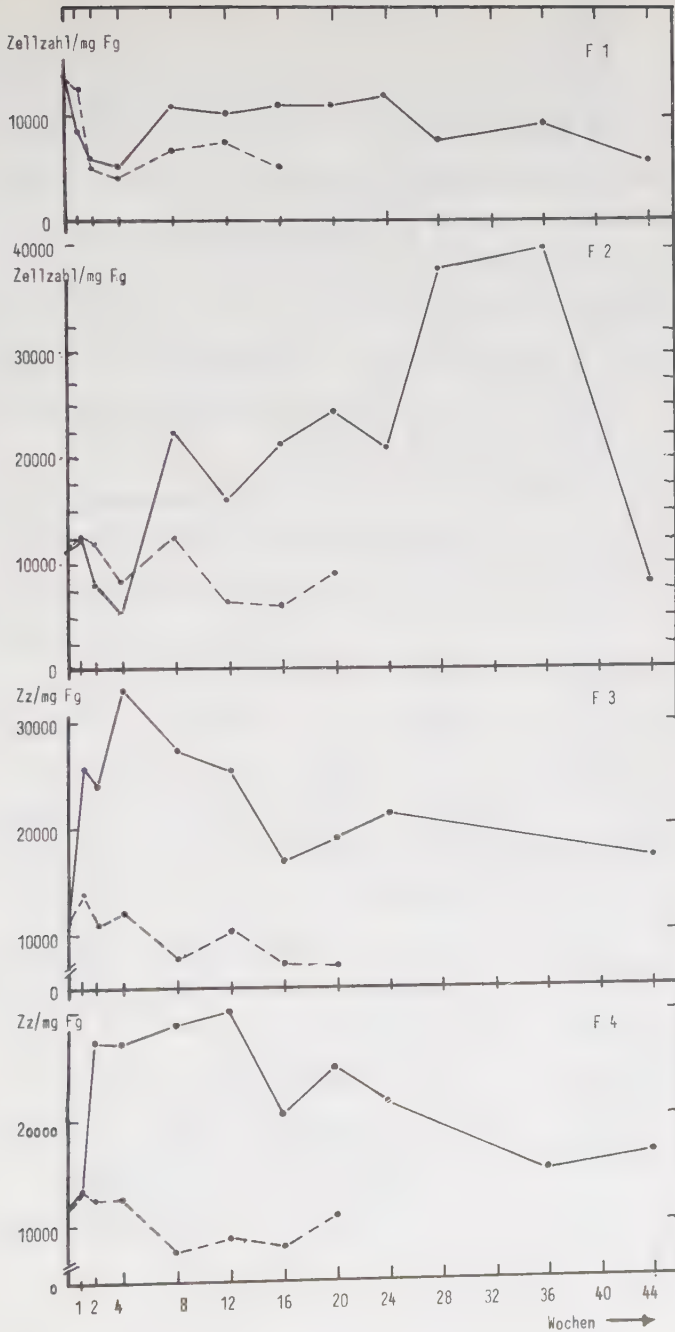


Abb. 6: Änderung der Zellzahl / Frischgewichtseinheit in den ersten 40 Wochen der Kulturzeit auf Ms (—) und Mw (---) am Beispiel von 4 Stämmen (F1-4).
Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe Ordinate: Zellzahl/mg Frischgewicht

nach 8 - 12 Wochen wiesen aber alle Ms-Kulturen durchschnittliche Zellzahlen von 20000 bis 30000/mg Frischgewicht auf (Ausnahme: F1). Dieses Niveau blieb mindestens bis zur 32. Woche erhalten (einzelne Stämme erreichten in diesem Zeitraum auch Zellzahlen bis zu 40000/mg Frischgewicht, Abb.6). Zwischen der 32. und 56. Woche fielen die Zellzahlen/mg Frischgewicht wieder ab, bis sich eine erneute Konstanz der Werte um 10000 einstellte. Auch nach 5 Jahren veränderten sich die Kulturen hinsichtlich ihrer Zellzahlen/mg Frischgewicht nicht mehr (Abb.7).

Bei Mw-Kulturen nahmen die Zellzahlen je mg Frischgewicht in jedem Fall zunächst ab. Ein Anstieg war meistens erst nach 24 Wochen zu verzeichnen, die durchschnittliche Zellzahl/mg Frischgewicht stieg dann auf knapp 20000 (Abb.7). Aber auch in diesem Zeitraum waren die Zellen von Ms-Kulturen im Durchschnitt kleiner als die von Mw-Kulturen, wie ein Vergleich von je 90 Zellen der Stämme E2 und 3 ergab. Bei manchen Mw-Stämmen waren 20000 Zellen/mg Frischgewicht auch noch nach 64 Wochen festzustellen, bei anderen waren die Zellzahlen/mg Frischgewicht zu diesem Zeitpunkt schon wieder auf unter 10000 abgesunken. Auch bei Mw-Kulturen änderte sich an diesen Werten im weiteren Verlauf der Kultivierung nichts mehr. Die Mw-Kulturen unterschieden sich bezüglich ihrer Zelldichten auch nicht mehr wesentlich von Ms-Kulturen.

Außer dem Medium hatte auch die Temperatur einen deutlichen Einfluß auf die zelluläre Zusammensetzung der Kulturen, bei Mw-Kulturen allerdings weniger ausgeprägt als bei Ms-Kulturen. Schon nach 4 Wochen lagen die Zellzahlen / mg Frischgewicht bei

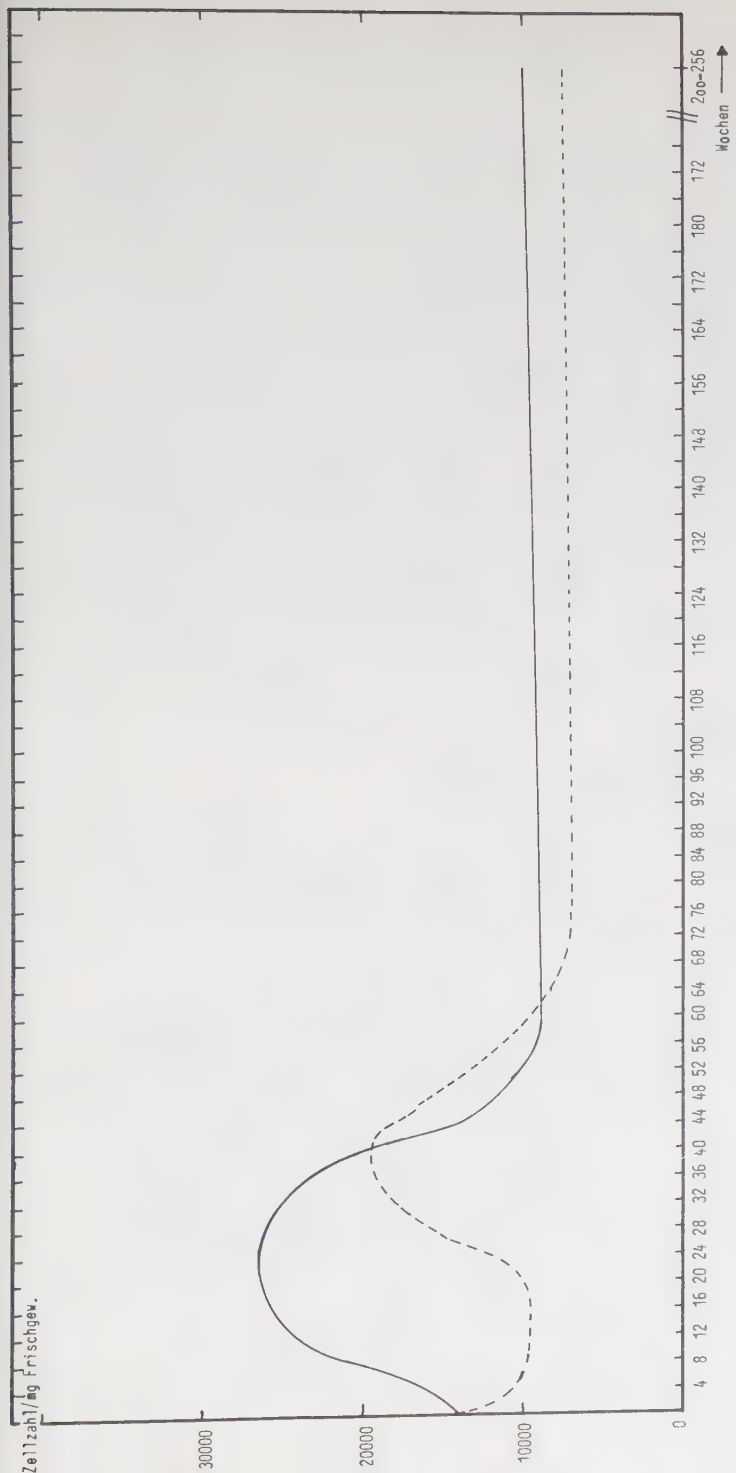


Abb.7: Änderung der Zellzahl pro Frischgewichtseinheit im Laufe der Kulturzeit

Trendkurve Ms ———

Trendkurve Mw - - - - -

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

O-dinate: Zellzahl / mg Frischgewicht

13°C-, 18°C- und 23°C-Ms-Kulturen höher als bei 28°C-Kulturen (Abb.8).

Von der 16. Woche ab stieg die Zellzahl je mg Frischgewicht um so höher je niedriger die Kultivierungstemperatur war. Bei 13°C-Kulturen wurden Zellzahlen bis zu 70000/mg Frischgewicht beobachtet. Entsprechend herrschten bei 13°C-Ms-Kulturen sehr kleine embryonale Zellen vor. Die Entwicklung der 18°C- und 23°C-Kulturen wurde bezüglich ihrer Zellzahlen nach der 28. Woche nicht weiter verfolgt, da vor allem 13°C-Kulturen den morphogenetischen Untersuchungen dienen sollten. Nach der 40. Woche fielen bei den 13°C-Kulturen die Zellzahlen / mg Frischgewicht langsam wieder ab, lagen aber nach 60 Wochen immer noch im Bereich des Maximums der 28°C-Kulturen zwischen 20000 und 30000 Zellen / mg Frischgewicht.

4. Zellteilungsaktivität

a) individuell beobachteter Einzelzellen

Zunächst wurde die Generationszeit (= Zeit zwischen zwei Teilungen) der Karottenzellen auf Ms-Medium und deren Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur an isolierten Einzelzellen untersucht. Die Beobachtung der Einzelzellen erfolgte in Petrischalen, auf deren Agar-bedeckten Böden Callus mit einem Spatel gleichmäßig verstrichen wurde. Durch das Verstreichen lösten sich von den größeren Gewebekomplexen Einzelzellen, die auf der Agarfläche mit Hilfe eines umgekehrten Mikroskopes beobachtet werden konnten. 30 Einzelzellen je Platte wurden auf der Unterseite der Petrischale markiert und dann alle 12 bis 24 Stunden auf Zellteilungen überprüft (Methode nach REINERT und BACKS-HÜSEMANN 1969).

Aus der Beobachtung von 710 Teilungen vom Zweizellstadium zum

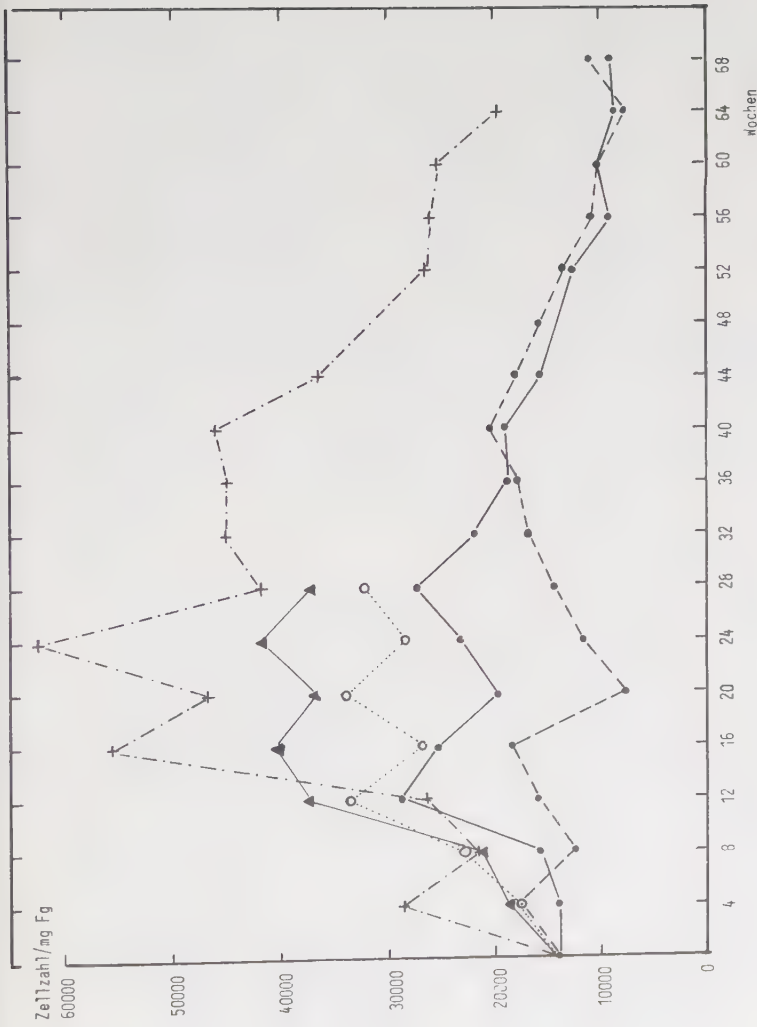


Abb. 8: Abhängigkeit der Zellzahl/frischgewichtseinheit von der Kultivierungstemperatur, Mittelwerte von je 3 Stämmen (E1-3)

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe Ordinate: Zellzahl/mg Frischgewicht

Vierzellstadium ergab sich eine recht breite Streuung der Generationszeiten bei 28°C (zwischen 24 Stunden und 15 Tagen, Abb.9B). 50% der Zellen teilten sich allerdings innerhalb von einem Tag. Eine mittlere Generationszeit ließ sich aus diesen Daten mit 1,85 Tagen errechnen. Aus einer Kurve, die die Vermehrung von 330 individuell beobachteten Einzelzellen wiedergibt (Abb.10), kann man ersehen, daß sich die Zeiten für eine Verdopplung der Zellpopulation bei der Entwicklung zum Mehrzellstadium verlängern. Bei der ersten Generation betrug sie 1,95 Tage, bei der zweiten 2,05 Tage.

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Generationszeit von der Temperatur untersucht. Die Platten wurden sofort nach dem Verstreichen des Gewebes in Brutschränke entsprechender Temperatur gebracht. Die mittlere Generationszeit war sowohl bei höheren Temperaturen (35°C: 2,4 Tage) als auch bei niedrigeren Temperaturen (20°C: 3,7 Tage) verlängert (Abb.9).

b) ganzer Explantate

Aber auch dann, wenn man die Zellen nicht individuell beobachten konnte, ließ sich errechnen, wieviele Generationen die Zellen durchschnittlich in einer 4-wöchigen Übertragungsperiode durchlaufen haben. Nimmt man an, daß die Zellkulturen exponentiell wachsen, so beträgt die Zellzahl N_1 nach der ersten Übertragungsperiode

$$N_1 = N_0 \cdot 2^n,$$

wobei N_0 die Anfangszellzahl des Kallusstückes und n die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen bedeuten sollen. Daraus läßt sich die durchschnittliche Anzahl an durchlaufenen Generationen berechnen:

$$n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2} \quad (\text{STREET and HENSHAW 1966}).$$

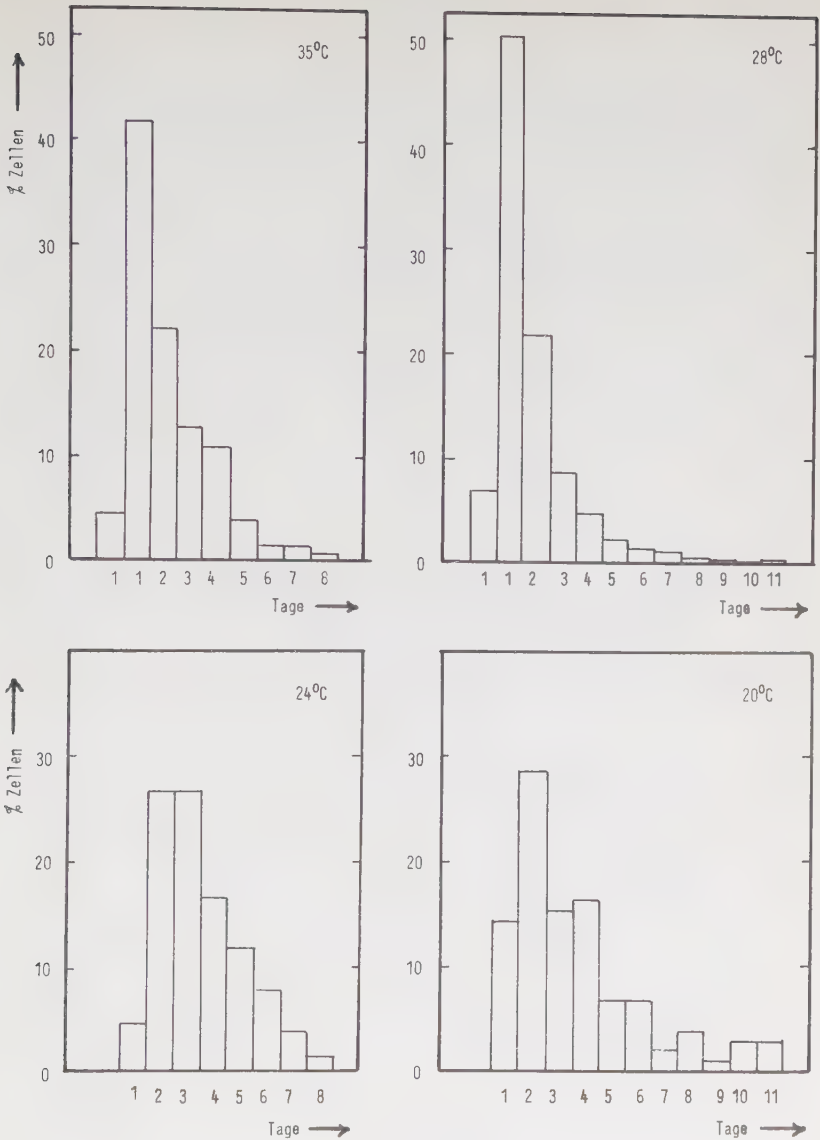


Abb 9: Verteilung der Generationszeiten von *Daucus carota*-Einzelzellen bei Kultivierungstemperaturen von 35°, 28°, 24° und 20°C.

35°C: 148 Zellen = 100 %

24°C: 127 Zellen = 100 %

28°C: 1420 Zellen = 100 %

20°C: 105 Zellen = 100 %

Abszisse: Länge der Generationszeit in Tagen

Ordinate: Anzahl der Zellen mit entsprechender Generationszeit in %

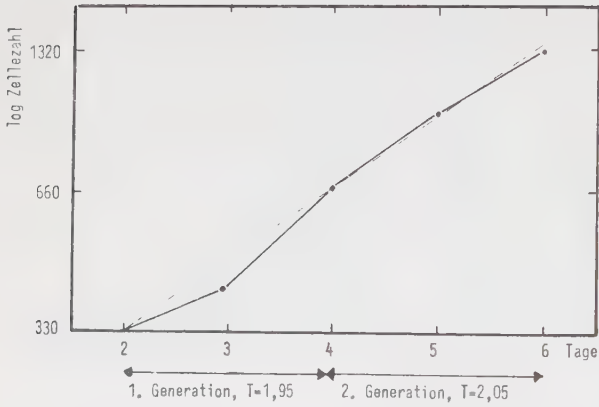


Abb.10: Wachstumskurve von Karotteneinzelzellen bei 28°C

- Experimentell ermittelte Kurve
- - - - Theoretische Kurve für T = 1,95 Tage

Abszisse: Versuchszeit in Tagen

Ordinate: log Zellzahl, ausgehend von 330 individuell beobachteten Einzelzellen

Da mit Frischgewicht und Zellzahl/mg Frischgewicht die Anzahl der Zellen je Explantat am Beginn und Ende einer Subkultivierungsperiode bekannt ist, kann man also auch die durchschnittliche Anzahl der durchlaufenen Generationen bestimmen. Allerdings erhält man nur einen Durchschnittswert für alle Zellen und die gesamten 4 Wochen, der nicht berücksichtigt, daß sich ein Teil der Zellen überhaupt nicht teilt (im Innern des Explantates) und die Teilungen außerdem wahrscheinlich hauptsächlich in der ersten Hälfte der Subkultivierungsperiode ablaufen. Es ergaben sich deshalb für Zellen von Ms-Kulturen bei 28°C nur durchschnittlich 2 Generationen in 4 Wochen, bei Mw-Kulturen (28°C) und Ms-Kulturen (13°C) 0,8 bis 1 Generation / 4 Wochen. Da die Verhältnisse in allen Explantaten aber ähnlich sind, kann die durchschnittliche Zahl an Generationen / 4 Wochen bei einem Vergleich der Kulturen als ein Maß für die Zellteilungsaktivität gelten.

Danach durchliefen Ms-Kulturen bei 28°C in derselben Zeiteinheit mehr als doppelt so viele Zellgenerationen wie Mw-Kulturen bei 28°C und Ms-Kulturen bei 13°C (Abb.11). Nur in den ersten 8 Wochen teilten sich die Zellen auch auf Mw-Medium (28°C) und Ms-Medium (13°C) öfter. Mw-Kulturen bei 28°C und Ms-Kulturen bei 13°C haben nahezu die gleiche Zellteilungsaktivität. Die durchschnittlichen Generationszeiten im Zeitraum von der 20. bis zur 72. Woche unterschieden sich zwischen Ms- 28°C -Kulturen und Ms- 13°C -Kulturen signifikant, die von Ms- 13°C -Kulturen und Mw- 28°C -Kulturen waren statistisch gleich.

Kulturen, die älter als 18 Monate waren, durchliefen auf Mw in 4 Wochen durchschnittlich eine, auf Ms zwei Generationen.

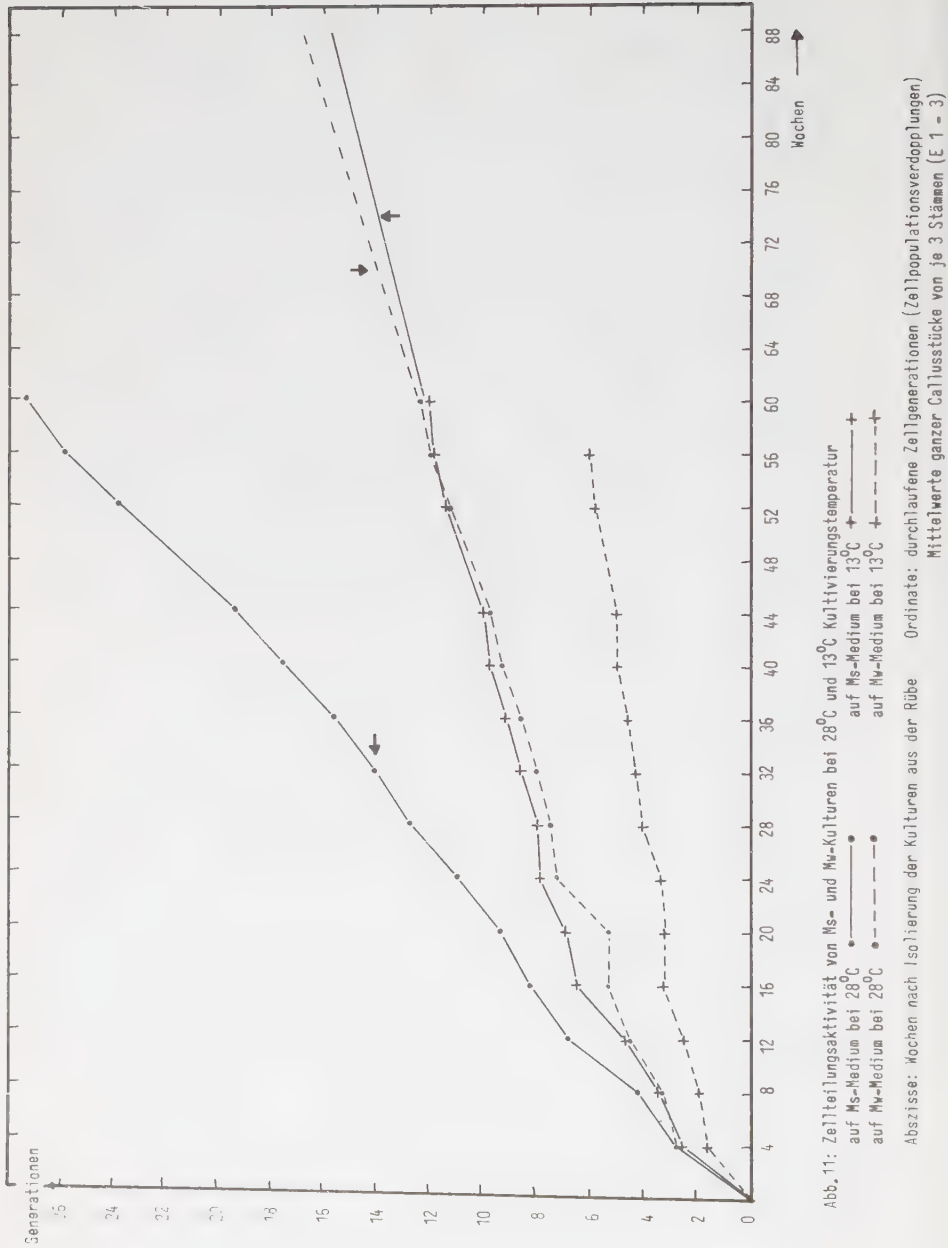


Abb. 11: Zellteilungsaktivität von Ms- und Mw-Kulturen bei 28°C und 13°C Kultivierungstemperatur
 auf Ms-Medium bei 28°C ● ————
 auf Mw-Medium bei 28°C ● - - - -
 auf Ms-Medium bei 13°C + ————
 auf Mw-Medium bei 13°C + - - - -

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe Ordinate: durchlaufene Zellgenerations (Zellpopulationsverdopplungen)
 Mittelwerte ganzer Callusstücke von je 3 Stämmen (E 1 - 3)

II Morphogenese der Karottengewebekulturen

Die beiden Medien Mw und Ms induzierten bei den Karottenkalli zwei grundsätzlich verschiedene morphogenetische Prozesse: während Ms-Kulturen vollständige Embryonen regenerierten, vermochten Mw-Kulturen lediglich Wurzeln zu bilden.

1. Embryogenese

a) Ergebnisse mikroskopischer Untersuchungen an embryobildenden Kulturen

Neben großen parenchymatischen Kalluszellen kamen in embryobildenden Kulturen immer Ansammlungen von kleinen embryonalen Zellen vor (Abb.12A). Diese Ansammlungen waren unregelmäßig geformt und konnten leicht in kleinere "Zentren" zerfallen. Als Weiterentwicklung der Zentren lagen kugelförmige Gebilde mit einer deutlich nach außen abgrenzenden Zellschicht vor (globuläre Stadien mit Protoderm, Abb.12 B, D). Aus den globulären bildeten sich dann herzförmige Stadien mit dem Sproßpol und den beiden Kotyledonen sowie dem Wurzelpol heraus (Abb.12C, D). Der herzförmige Embryo streckte sich dann zu einem torpedoförmigen (Abb.12D), der oft zu einem makroskopisch sichtbaren Pflänzchen heranwuchs.

Der quantitative Anteil der embryonalen Zellen am Gesamtexplantat war sehr verschieden. Es gab Stämme, deren Kulturen fast ausschließlich aus Zentren, globulären Stadien, herz- und torpedoförmigen Embryonen sowie makroskopisch sichtbaren Pflänzchen bestanden (z.B. Stämme E2, F3). Das andere Extrem zeigte nur vereinzelt Zentren und Embryonen in den unorganisierten Kallusmassen (F1). Diese unterschiedliche Differenzierung der Kulturen war offensichtlich durch Eigenschaften der Ausgangsrübe festgelegt. Der Anteil der

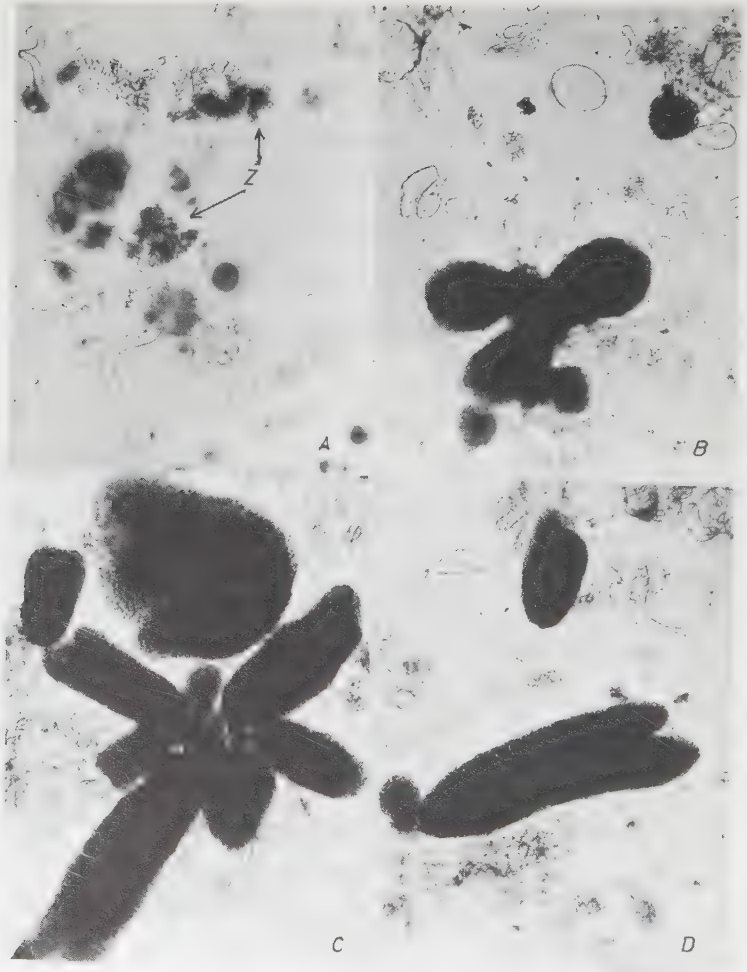


Abb.12: In wasser aufgeschwemmter Kallus von Ms-Kulturen mit verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien:

A: "Zentren"

C: herz- und torpedoförmige Embryonen,
Embryo mit mehreren Kotyledonen

B: globuläre Stadien D: globuläre, herz- und torpedoförmige Stadien

embryonalen Zellen an der Gesamtkultur sank außerdem immer im Verlauf der Kultivierung. Auch bei E2 und F3 waren Embryonen und Zentren ca. 50 Wochen nach der Isolierung der Kulturen nur noch sporadisch zwischen den Kalluszellen zu finden.

Das Verhältnis von makroskopisch sichtbaren Embryonen zu wenig weit entwickelten änderte sich ebenfalls nach längerer Kulturdauer. Oft traten nach 50 Wochen nur noch herzförmige Embryonen auf, schließlich nur globuläre Stadien und Zentren. Nach ungefähr 100 Wochen waren auch diese nicht mehr vorhanden.

Senkung der Temperatur hemmte die Embryogenese. Während die Embryonen bei 18°C nur bis zum herz- oder torpedoförmigen Stadium gediehen und viele im globulären Stadium verblieben, entwickelten sie sich bei 13°C nicht über die Globusbildung hinaus und wiesen vermehrt Zentren auf.

Neben dieser normalen Entwicklung wurden auch Mißbildungen beobachtet. So konnten statt zwei Kotyledonen 3 und mehr angelegt werden (Abb.12C), oder der Embryo rollte sich stark zusammen und war im Bereich der Achse verdickt.

b) Abhängigkeit der Embryobildung von der Kulturdauer und der Temperatur

Die Intensität der Embryobildung, ausgedrückt in Prozent embryobildender Kulturen, war abhängig von der Kulturdauer wie auch von der Temperatur.

Die Ms-Kulturen E1-3 begannen bei 28°C zwischen der 4. und 8. Woche nach Isolierung aus der Rübe mit der Embryogenese und erreichten nach 12 Wochen schon maximale Werte um 100 % (Abb.13). Bis zur 32. Woche bildeten nahezu alle Kulturen Embryonen, danach fiel die

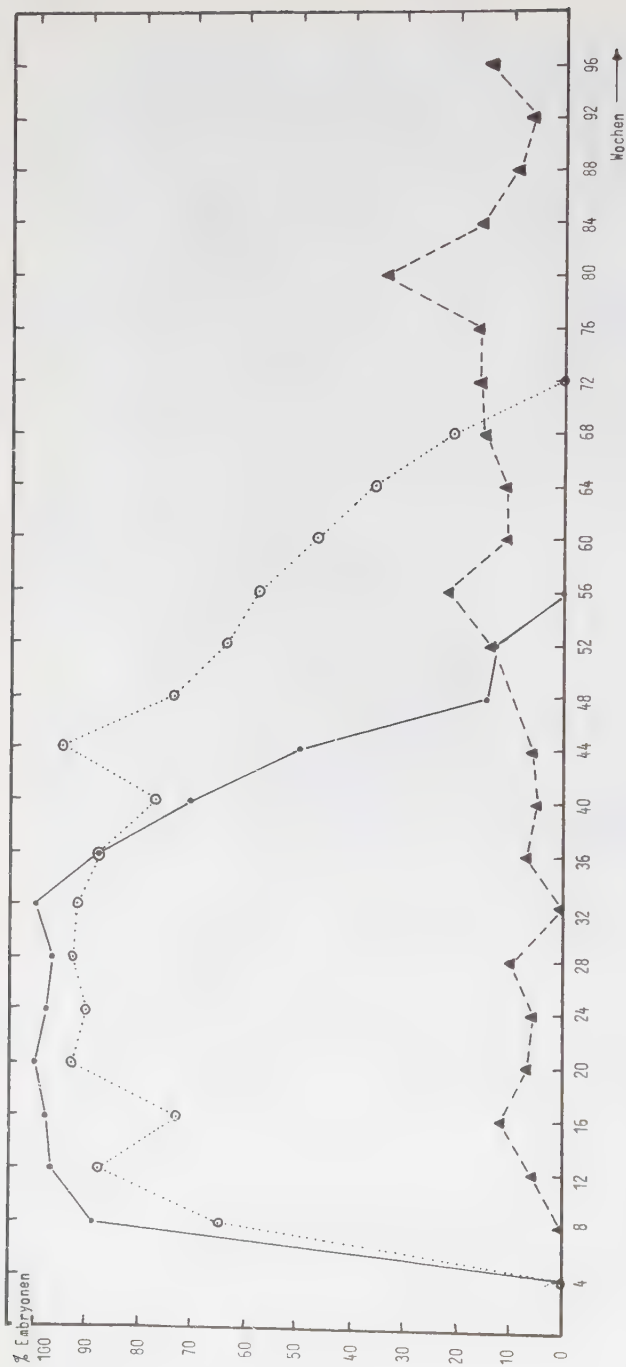


Abb. 13: Abhängigkeit der Embryonenbildung von der Kultivierungstemperatur.

28°C —●—
 23°C —○—
 18°C —▲—

Abzisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

Ordinate: % Kulturen mit Embryonenbildung; Mittelwerte von 3 Stämmen (E 1 - 3), je Stamm 8 - 20 Kulturen

Fähigkeit zur Morphogenese kontinuierlich ab. Nach der 56. Woche waren keine Embryonen mehr zu beobachten.

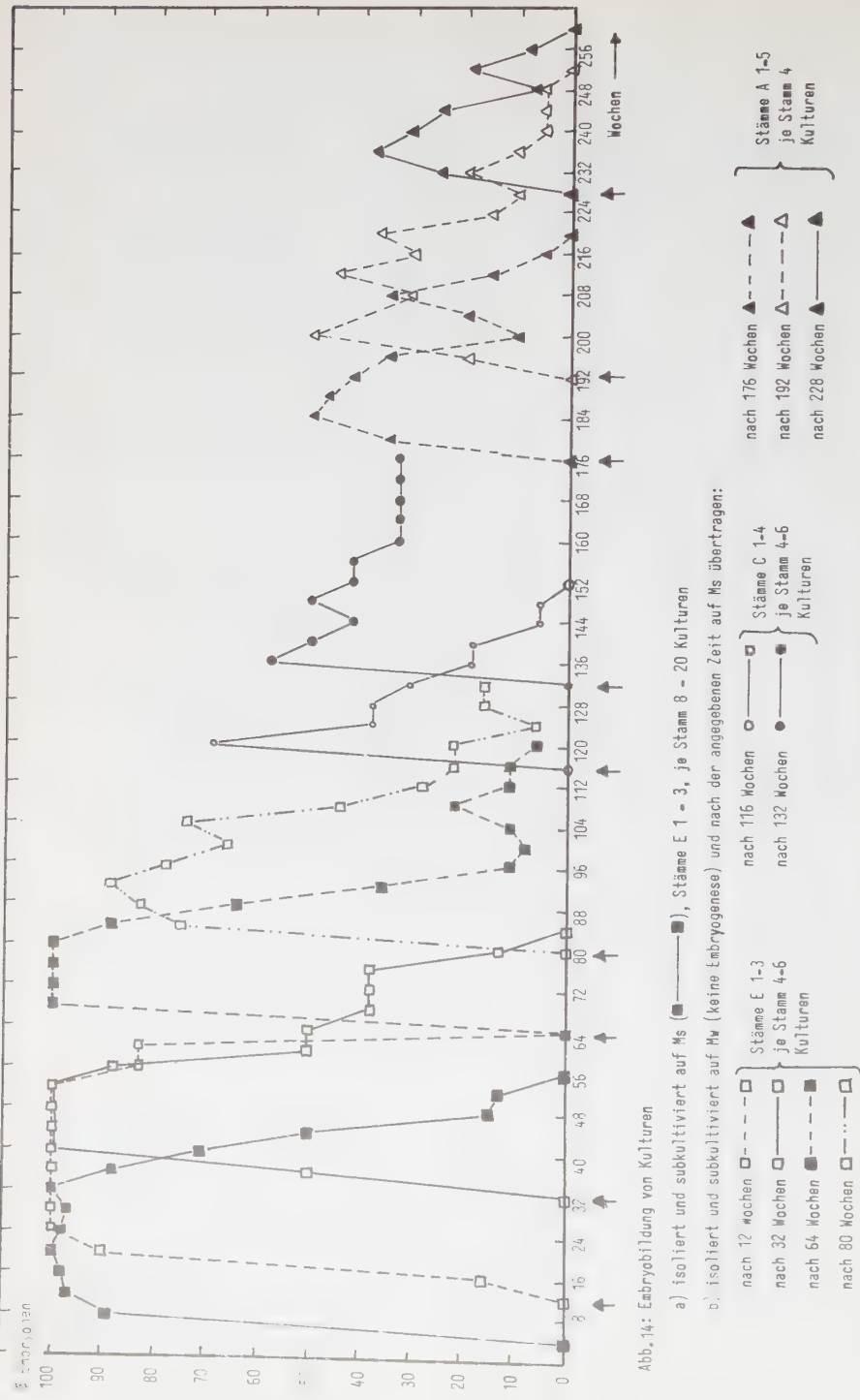
Auch bei der Kultivierungstemperatur von 23°C traten die ersten Embryonen zwischen der 4. und 8. Woche auf. Die maximalen Werte lagen hier jedoch bei nur 90 %, während die Fähigkeit zur Morphogenese länger als bei einer Temperatur von 28°C erhalten blieb. Sie nahm erst nach 44 Wochen langsam ab und war nach 72 Wochen ganz erloschen. Um neben dem Prozentsatz embryobildender Kulturen auch die Länge des Kulturabschnittes, während dessen Kulturen Embryonen bildeten, mit in die Wertung einzubeziehen, wurde als Maß für die Gesamtkapazität die Fläche unter der jeweiligen Kurve in Abb.13 bestimmt. Danach ist die Gesamtkapazität der 23°C -Kulturen um den Faktor 1,3 größer als die der 28°C -Kulturen.

Bei 13°C und 18°C zeigten sich nur Ansätze der Morphogenese. Bei 13°C entwickelten sich überhaupt keine fertigen Embryonen, bei 18°C bildeten immer nur wenige Kulturen (zwischen 10 und 20 %) herz- oder torpedoförmige Stadien. Die Embryogenese begann erst nach 12 Wochen, allerdings war auch nach 108 Wochen noch kein Rückgang dieser schwachen morphogenetischen Potenzen zu bemerken; lediglich die Kallusbildung nahm von der 80. Woche an bei 13°C - und 18°C -Kulturen langsam zu. Die 18°C -Kulturen erreichten erst nach 108 Wochen etwa ein Drittel der Gesamtkapazität der 28°C -Kulturen.

c) Erhaltung der Fähigkeit zur Embryogenese durch Wachstumsretardierung

Es wurden nun Versuche durchgeführt, die Aufschluß über die Ursachen der Abnahme der Embryogenese geben sollten.

Auf Mw isolierte Kulturen bildeten keine Embryonen. Übertrag man



sie nach 12 bzw. 32 Wochen auf induktives Ms-Medium, so waren auch bei ihnen schon nach weiteren 4 Wochen in einzelnen, und nach 12 bzw. 8 Wochen in allen umgesetzten Kulturen Embryonen zu beobachten (100 %, Abb.14). Die Fähigkeit zur Embryogenese nahm auch bei den umgesetzten Kulturen mit der Zeit ab; daraus ergaben sich ähnliche Glockenkurven wie bei Kulturen, die von Anfang an auf Ms gewachsen waren.

Übertrag man Mw-Kulturen auf Ms zu einem Zeitpunkt, zu dem Ms-Kulturen die Fähigkeit zur Embryogenese schon verloren hatten (z.B. nach 64 Wochen), so traten schon nach 4 Wochen bei allen umgesetzten Kulturen Embryonen auf. Die Fähigkeit zur Embryogenese war also bei diesen Kulturen noch nicht erloschen. Zur Überprüfung der Mw-Kulturen auf ihre Fähigkeit zur Embryogenese wurden sie bis zu einem Alter von 228 Wochen auf Ms umgesetzt (Abb.14). Außer einem (C3) reagierten dabei alle Stämme positiv. Allerdings wurden Maxima von durchschnittlich 100 % nach 80 Wochen nicht mehr erreicht, sondern schließlich nur noch solche von 40 %. Das wurde dadurch bedingt, daß die Zu- und Abnahme der Embryogenese bei den einzelnen Stämmen immer unregelmäßiger verlief; die Kurven wichen mehr und mehr von der Glockenform ab und wiesen oft mehrere Maxima auf. Auch bildeten nicht mehr sämtliche Kulturen der einzelnen Stämme Embryonen (Tab.4). Die Zeitspanne, in der jeweils überhaupt Embryogenese zu beobachten war, blieb dagegen ungefähr gleich zwischen 32 und 60 Wochen. Nur für die Kulturgruppe B verkürzte sich die Dauer auf 16 bis 20 Wochen (umgesetzt nach der 116., 128., 148. Woche

Auch Ms-Kulturen bildeten bei 13°C keine Embryonen. Wenn sie aber wie die Mw-Kulturen unter induktive

Tab.4: Beispiele für die Heterogenität älterer Mw-Kulturen
bezüglich Embryogenese nach Umsetzen auf Ms.

Stamm	umgesetzt nach	% Kulturen mit Embryogenese							
	176 Wch	180	184	188	192	196	200	204	208 Wochen
A 1		0	0	0	0	0	0	0	0
A 2		66	<u>75</u>	50	25	0	50	50	0
A 3		0	25	<u>50</u>	<u>50</u>	0	0	0	0
A 4		0	0	0	0	0	<u>50</u>	0	0
A 5		<u>100</u>	<u>100</u>	50	50	25	0	0	0
Ø		33	45	30	25	5	20	10	0
	192 Wch	196	200	204	208	212	216	220	224 Wochen
A 1		0	0	0	75	75	<u>100</u>	<u>100</u>	75
A 2		50	<u>100</u>	0	50	50	25	33	0
A 3		0	<u>50</u>	0	-	-	-	-	-
A 4		0	0	0	0	<u>75</u>	25	50	0
A 5		50	<u>100</u>	25	25	25	0	0	0
Ø		20	50	5	30	45	30	37	15
	212 Wch	216	220	224	228	232	236	240	244 Wochen
A 1		0	0	0	0	0	0	0	0
A 2		0	33	50	<u>75</u>	25	<u>75</u>	25	50
A 3		25	0	0	0	<u>50</u>	<u>50</u>	0	0
A 4		25	50	<u>75</u>	50	0	50	25	0
A 5		<u>100</u>	50	0	25	25	0	0	0
Ø		30	27	25	30	20	35	10	0
	228 wch	232	236	240	244	248	252	256	260 Wochen
A 2		0	0	25	50	0	<u>75</u>	25	0
A 3		0	0	0	0	0	0	0	0
A 4		0	25	<u>50</u>	25	0	0	0	0
A 5		<u>100</u>	<u>100</u>	75	0	0	0	0	0
Ø		25	38	31	25	6	19	8	0

Bedingungen (Ms, 28°C) gebracht wurden, so reagierten sie ähnlich wie diese (Abb.15) mit einem Anstieg der Embryogenese auf 100 % und anschließendem Absinken während eines Zeitraumes von ca. 52 Wochen nach der Übertragung der Kulturen von 13°C - unter 28°C -Bedingungen. Diese Reaktionsnorm galt auch noch für Kulturen, die erst nach 56 Wochen von 13°C in 28°C transferiert wurden. Aber auch hier wurde von der 80. Woche an keine 100%ige Morphogenese mehr erreicht.

Die Gesamtkapazität (Flächen unter den Kurven) nahm bei 28°C -Mw-Kulturen wie auch bei 13°C -Ms-Kulturen im Laufe der Kulturzeit ab (Abb. 16).

Mw-Kulturen bei 28°C und Ms-Kulturen bei 13°C hatten ungefähr die gleichen Wachstumsraten sowohl hinsichtlich der Frischgewichtszunahme als auch der Zellteilung (vgl.Kap. I1 und I4b, Abb.3 und 11). Unter beiden Bedingungen wuchsen die Kulturen ca. $2/3$ langsamer als Ms-Kulturen bei 28°C , Bis zur 32. Woche nach Isolierung aus der Rübe bildeten Ms-Kulturen bei 28°C zu 100 % Embryonen; das entsprach 14 Verdopplungen der Zellpopulation (Abb.11). Um dieselbe Anzahl von Generationen zu durchlaufen, benötigten Mw-Kulturen bei 28°C und Ms-Kulturen bei 13°C etwa 72 Wochen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Kulturen ebenfalls noch zu 100%iger Embryogenese fähig, wenn sie auf Ms-Medium bei 28°C umgesetzt wurden (Abb.14 und 15). Weitere 12 Generationen später war bei Ms-Kulturen die Embryobildung erloschen. Dasselbe war bei den langsamer wachsenden Mw-Kulturen zu erwarten, wenn sie erst nach 144 Wochen, also nach 12 weiteren Generationen, auf Ms bei 28°C übertragen wurden. Dieses

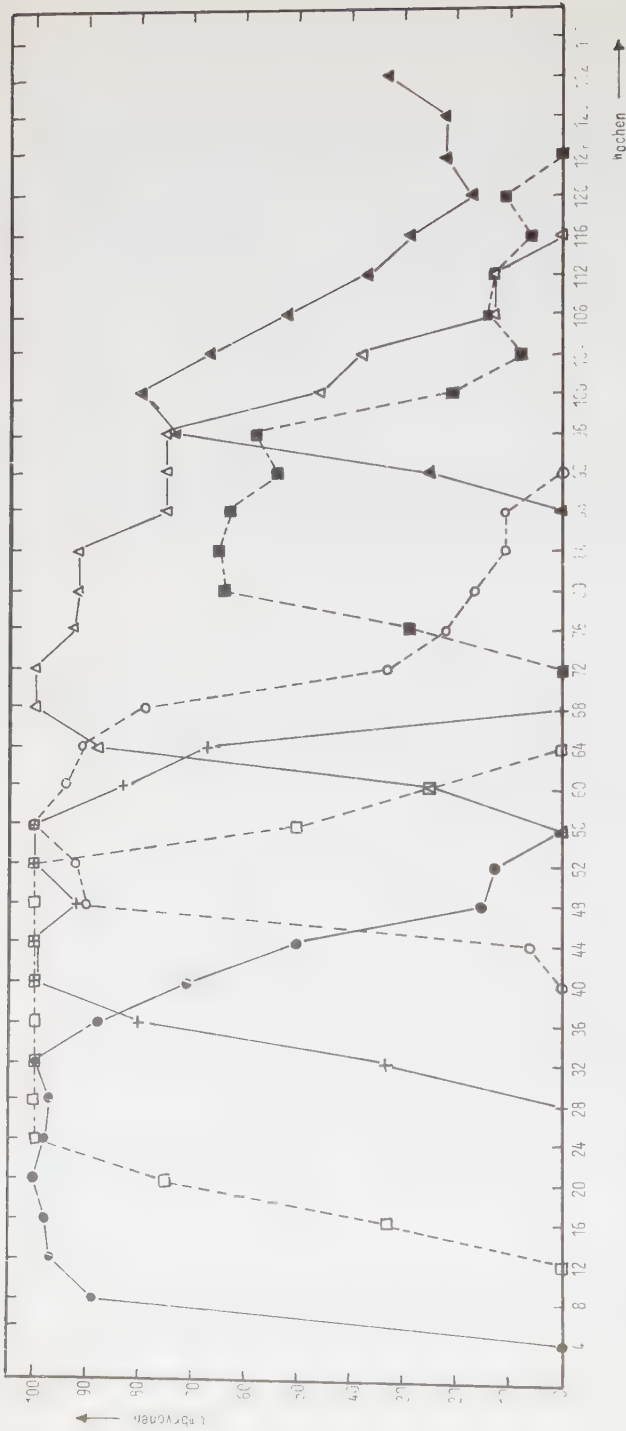


Abb. 15: Embryonalentwicklung von Kulturen

a) isoliert und subkultiviert auf Ms bei 28°C (●—●)

b) isoliert und subkultiviert auf Ms bei 13°C (keine Embryogenese) und nach der angegebenen Zeit bei 28°C weitergezogen:

nach 12 Wochen □- - - nach 56 Wochen △—△

nach 28 Wochen +—+ nach 72 Wochen ■- - -

nach 40 Wochen ○- - - nach 88 Wochen ▲—▲

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

Ordinate: % Kulturen mit Embryogenese (Mittelwerte von 3 Stämmen E 1 - 3, je Stamm 4 - 20 Kulturen)

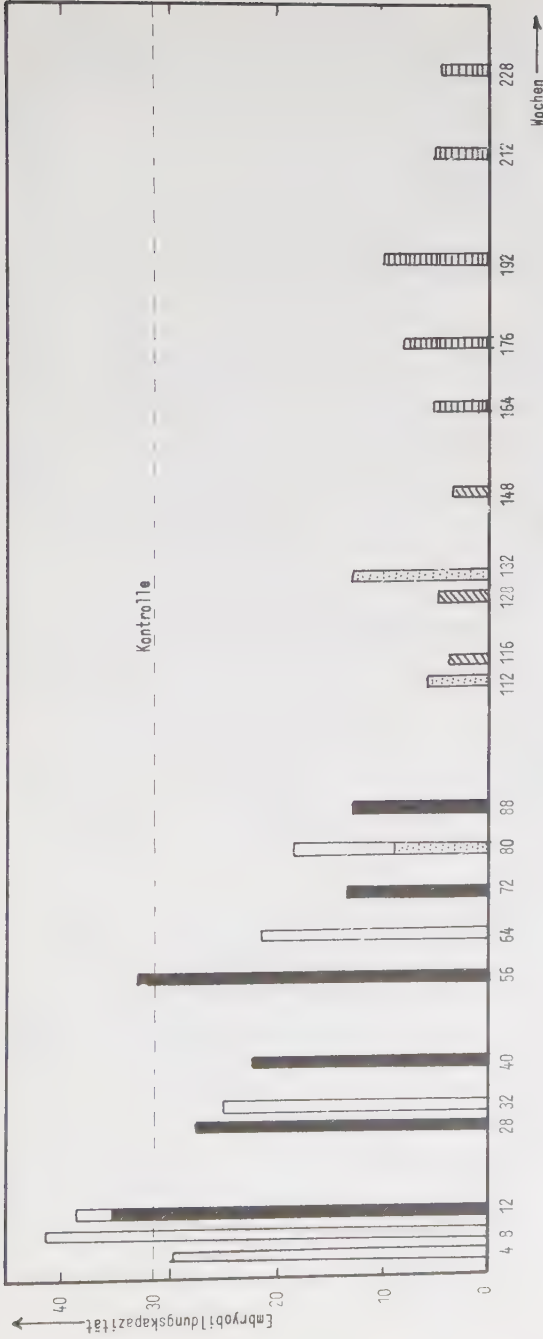


Abb.16: Abnahme der Embryonalbildungskapazität im Laufe der Kulturdauer. Kontrolle = Ms-Kulturen 28°C (E1-3)

- Stämme E1-3, isoliert auf Mw und nach 4, 8, 12, 32, 64 bzw. 80 Wochen übertragen auf Ms
- Stämme E1-3, isoliert auf Ms 13°C und nach 12, 28, 40, 56, 72 bzw. 88 Wochen übertragen auf Ms 28°C
- ▤ Stämme C1-4, isoliert auf Mw und nach 80, 112 bzw. 132 Wochen übertragen auf Ms
- ▥ Stämme B1-3, isoliert auf Mw und nach 116, 128 bzw. 148 Wochen übertragen auf Ms
- ▧ Stämme A1-5, isoliert auf Mw und nach 164, 176, 192, 212 bzw. 228 Wochen übertragen auf Ms

Abzisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rüte

Ordinate: Embryonalbildungskapazität = Fläche unter den jeweiligen Kurven in Abb.14 und 15
in relativen Einheiten

Alter aber hatten die hier untersuchten Stämme E 1-3 während der Durchführung dieser Arbeit noch nicht erreicht. Da jedoch 8 andere Stämme (B1-3, A1-5) auch nach der 144. Woche ihre Fähigkeit zur Embryogenese noch nicht verloren hatten, ist es wahrscheinlich, daß die zeitliche Dauer zwischen 100 % und dem Verlust der Fähigkeit zur Embryobildung nicht streng von der Anzahl der Generationen abhängig ist.

Die These, daß die Fähigkeit zur Embryogenese bei langsamer wachsenden Kulturen länger erhalten bleibt, wurde durch zwei weitere Befunde gestützt. Wenn Mw-Kulturen der Stämme D 1-3 ab der 72. Woche bei 28°C oder bei 13°C gehalten und nach 7 und 11 Übertragungsperioden (100. und 116. Woche) auf Ms 28°C umgesetzt wurden, bildeten die Mw-28°C-Kulturen nur noch zu 85 % Embryonen, während die Kurve der Mw-13°C-Kulturen beide Male noch auf 100 % anstieg (Abb.17).

Stellte man die Mw-Kulturen (C 1-4) dagegen erst ab der 84. Woche in 13°C-Klimatruhen und übertrug sie nach 96, 112 und 132 Wochen auf Ms 28°C, dann erreichten auch sie, die vorher bei 13°C sehr langsam gewachsen waren, nicht mehr die 100%ige Embryobildung.

Gleichermaßen behielten auch Ms-Kulturen, die bis zur 12. Woche bei 13°C und dann bei 5°C gewachsen waren, ihre Fähigkeit zur Embryogenese länger als Ms-13°C-Kulturen. Während das Umsetzen der letzteren nach 88 Wochen auf Ms 28°C nur noch zu 80 % Embryonen führte, erreichten die Ms-5°C-Kulturen noch 100 % (Abb.18).

Es zeigte sich also eindeutig, daß langsamer wachsende Kulturen die Fähigkeit zur Embryogenese länger behielten. Es blieb hierbei gleichgültig, ob die Retardierung des Wachstums durch Stickstoffmangel (Mw)

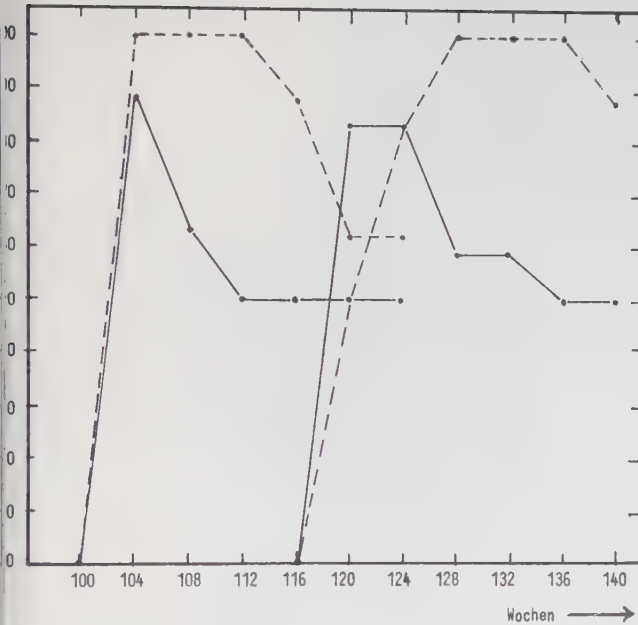


Abb. 17: Embryobildung von Kulturen

a) isoliert und subkultiviert auf Mw 28°C und nach 100 bzw. 116 Wochen auf Ms 28°C übertragen (—)

b) isoliert und subkultiviert auf Mw 28°C, ab der 72. Woche auf Mw 13°C und nach 100 bzw. 116 Wochen auf Ms 28°C übertragen (---)

Mittelwerte von 2 Stämmen (D1-2), je Stamm 4-6 Kulturen

Abzisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

Ordinate: % Kulturen mit Embryogenese

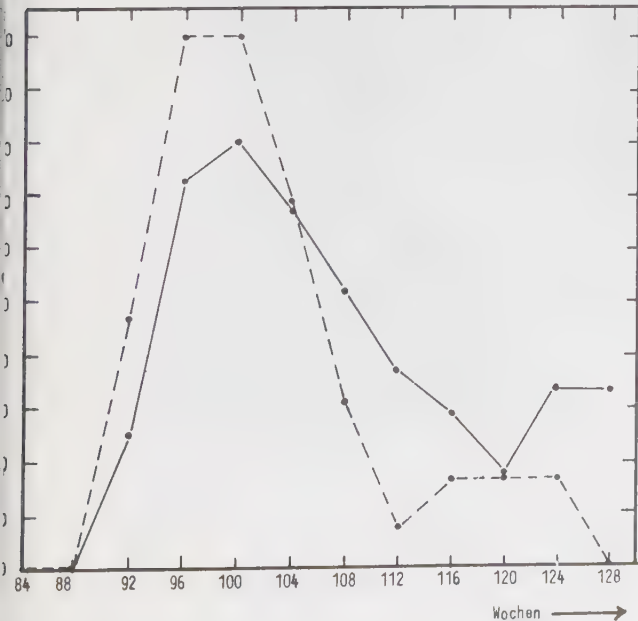


Abb. 18: Embryobildung von Kulturen

a) isoliert und subkultiviert auf Ms 13°C und nach 88 Wochen auf Ms 28°C übertragen (—)

c) isoliert und bis zur 12. Woche subkultiviert auf Ms 13°C, dann auf Ms 5°C und nach 84 Wochen auf Ms 28°C übertragen (---)

Mittelwerte von 3 Stämmen (E1-3), je Stamm 4-8 Kulturen

oder durch niedrige Temperaturen (13°C bzw. 5°C) hervorgerufen worden war.

2. Rhizogenese

a) Ergebnisse mikroskopischer Untersuchungen an wurzelbildenden Kulturen

In Mw-Kulturen kamen neben dünnwandigen Parenchymzellen auch solche mit tracheidalen Zellwandverstärkungen vor, ohne daß die Zellform von der der dünnwandigen Parenchymzellen abwich (Abb.19A). Zentren embryonaler Zellen traten nur vereinzelt auf und stellten einen geringen Anteil an der Gesamtzellpopulation, verglichen mit embryobildenden Ms-Kulturen. Diese Zentren waren auch nicht scharf gegen den übrigen Kallus abgegrenzt sondern mehr oder weniger übergangslos in diesen eingebettet (Abb.19B). Aus ihnen entwickelten sich offenbar Strukturen, deren seitlicher spitzkegeliger Auswuchs schließlich durch Wurzelhaube und zentrale Leitbahnen als Wurzel zu erkennen war (Abb.19C,D,E). Mitunter entstanden aus einem Zentrum auch mehrere Wurzeln, die sich auch verzweigen konnten (Abb.19E).

b) Abhängigkeit der Wurzelbildung von Kulturdauer und Temperatur

Die Wurzelbildung der Stämme E 1-3 auf Mw begann bei 28°C zwischen der 8. und 12. Woche nach Isolierung der Kulturen (Abb.20). Sie erreichte ihr Maximum zwischen der 40. und 60. Woche und nahm dann langsam ab. Um die 140. Woche näherten sich die Mittelwerte, ebenso wie bei den Stämmen C 1-4, dem Nullpunkt. Bei 4 der 18 beobachteten Stämme war die Rhizogenese nach 100 Wochen erloschen, bei C3 schon nach 84 Wochen. Es gab allerdings auch Stämme (A 1-5), die sogar noch nach 200 Wochen maximale Wurzelbildung zeigten, die bis zur 280. Woche nur langsam nachließ.

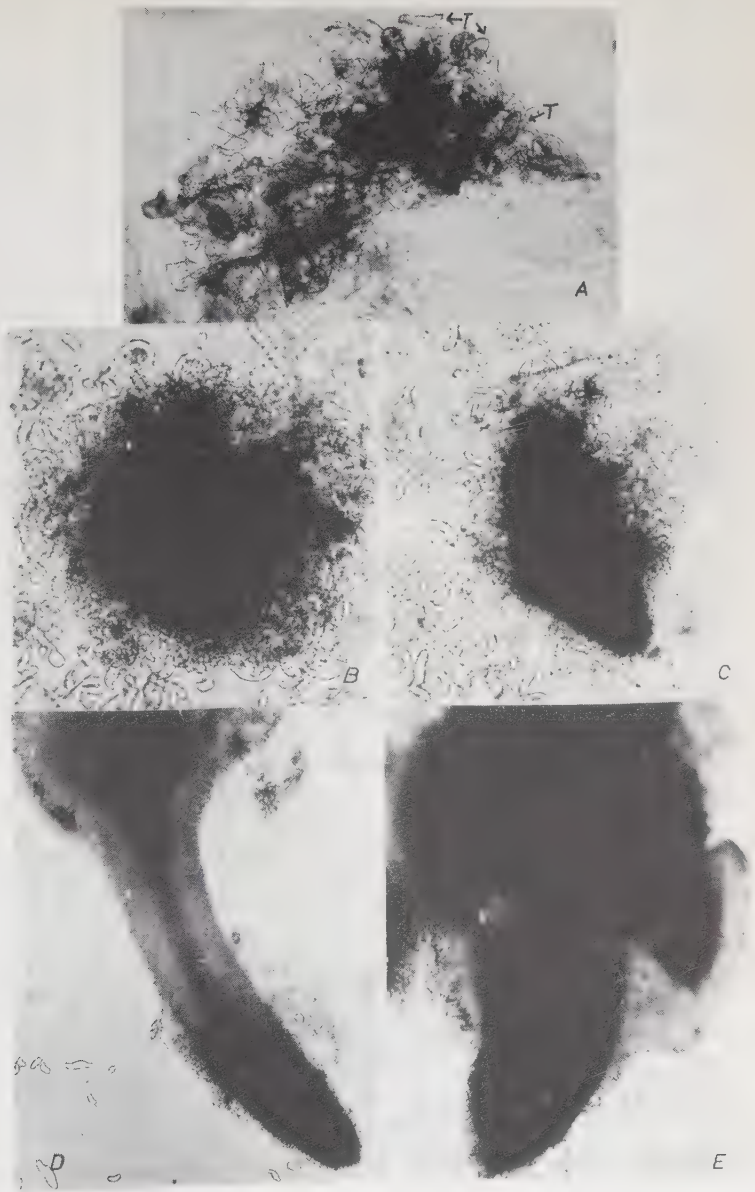


Abb.19: In Wasser aufgeschwemmter Kallus von Mw-Kulturen mit verschiedenen Wurzel-Entwicklungsstadien:
 A: Kalluszellen mit Tracheiden B: "Wurzelzentren"
 C: beginnendes Auswachsen der Wurzel D: Wurzel mit Leitba
 E: Wurzelzentrum, aus dem zwei Wurzeln entstehen

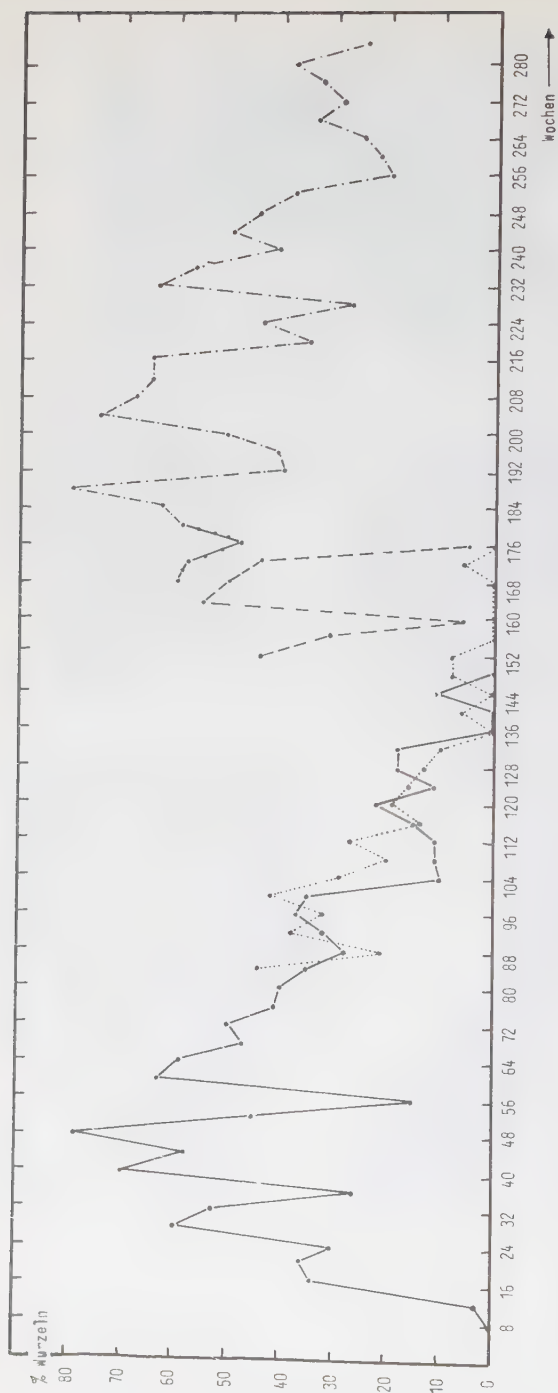


Abb. 20: Wurzelbildung auf Mu bei $28^{\circ}C$ über eine 5-jährige Kulturdauer.

— Stämme E 1 - 3 (10 - 20 Kulturen / Stamm)
 Stämme C 1 - 4 (4 - 6 Kulturen / Stamm)
 - - - Stämme D 1 - 3 (4 - 6 Kulturen / Stamm)
 - . . . Stämme A 1 - 5 (4 - 10 Kulturen / Stamm)

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe
 Ordinate: % Kulturen mit Wurzelbildung

Die Rhizogenese war nicht so temperaturabhängig wie die Embryogenese (Abb.21). Bei 23°C setzte die Wurzelproduktion zwar 4 Wochen, bei 18°C 16 Wochen später ein, doch war sie von der 52. Woche an bei 18 bis 28°C von gleicher Intensität. Nur bei 13°C-Kulturen trat eine deutliche Hemmung ein: Wurzelbildung begann erst nach der 60. Woche und betrug nur ca. 10 %.

Auffällig waren die starken Schwankungen für die Wurzelbildungskurven; so wurden bei E 1-3 innerhalb von 8 Wochen nacheinander 80, 50 und sogar nur 15 % der Kulturen mit Rhizogenese beobachtet, danach wieder 63 %.

III DNS-Gehalt der Karottengewebekulturen

In den folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob sich die Kulturen hinsichtlich ihres DNS-Gehaltes im Laufe der Kulturzeit verändern und ob diese Veränderungen mit ihrer Morphogenesefähigkeit korreliert sind. Dazu wurde der DNS-Gehalt der Kulturen biochemisch bestimmt.

In der Karotte betrug die Menge an DNS bezogen auf 100 mg Trockenmasse 30 µg; das entsprach $3,4 \cdot 10^{-6}$ µg DNS/Zelle (Abb.22). Es wurden insgesamt 4 Karotten untersucht und relativ gut übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Schon in der ersten Woche nach Isolierung der Kulturen stieg der DNS-Gehalt auf Ms-Medium deutlich an, um nach 4 Wochen zunächst ein Maximum von durchschnittlich 126 µg DNS/100 mg Trockenmasse bzw. $6,4 \cdot 10^{-6}$ µg DNS/Zelle zu erreichen. Die untersuchten Stämme F 1-4 verhielten sich dabei im Einzelnen wieder recht unterschiedlich, wie es sich schon bei den Zellzahlen/mg Frischgewicht gezeigt hatte (Abb.23, 24, Tab.5). Bei Stamm F1 nahm der DNS-Gehalt je Trockengewichtseinheit in den ersten 4 Wochen zu, obwohl die Zellzahl je Frischgewichtseinheit sank; bei Stamm F3

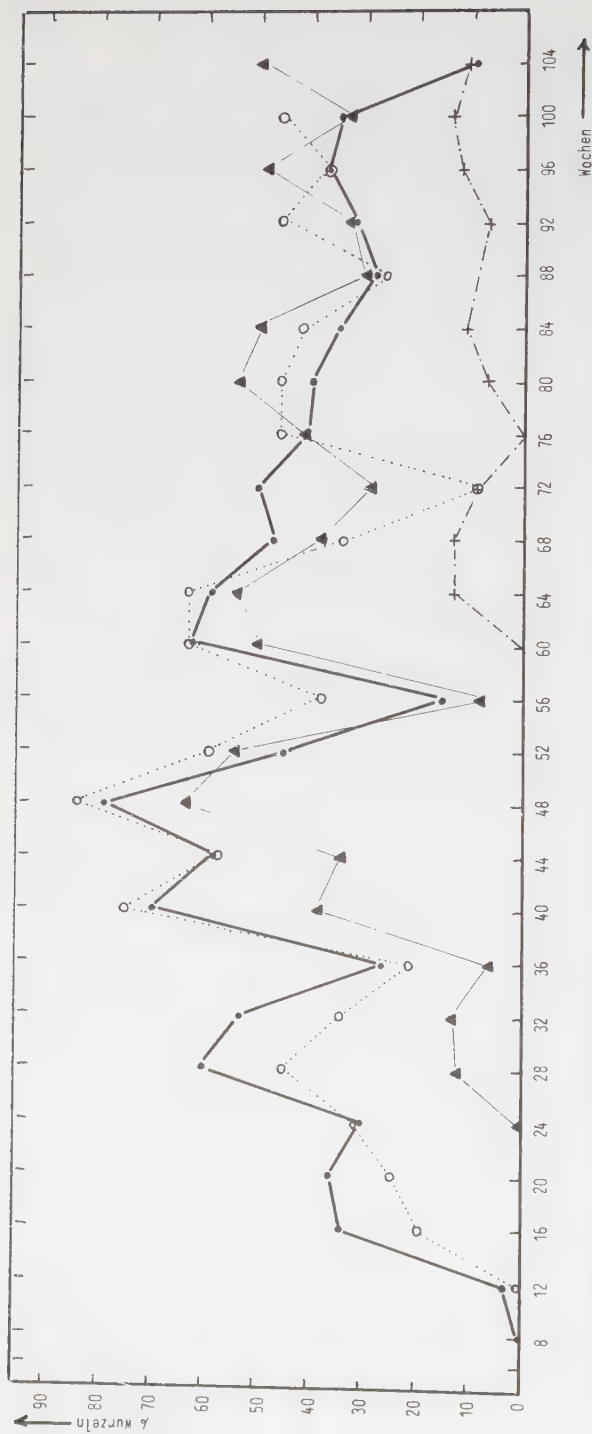


Abb. 21: Abhängigkeit der Wurzelbildung von der Kultivierungstemperatur; Mittelwerte von 3 Stämmen (E1-3), je Stamm 4 - 20 Kulturen

$\bullet$ — $M_W 28^\circ C$ $\circ$ — — — $M_W 23^\circ C$
 $\blacktriangle$ — — — $M_W 18^\circ C$ + — — — + $M_W 13^\circ C$

Abzisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

Ordinate: % Kulturen mit Wurzelbildung

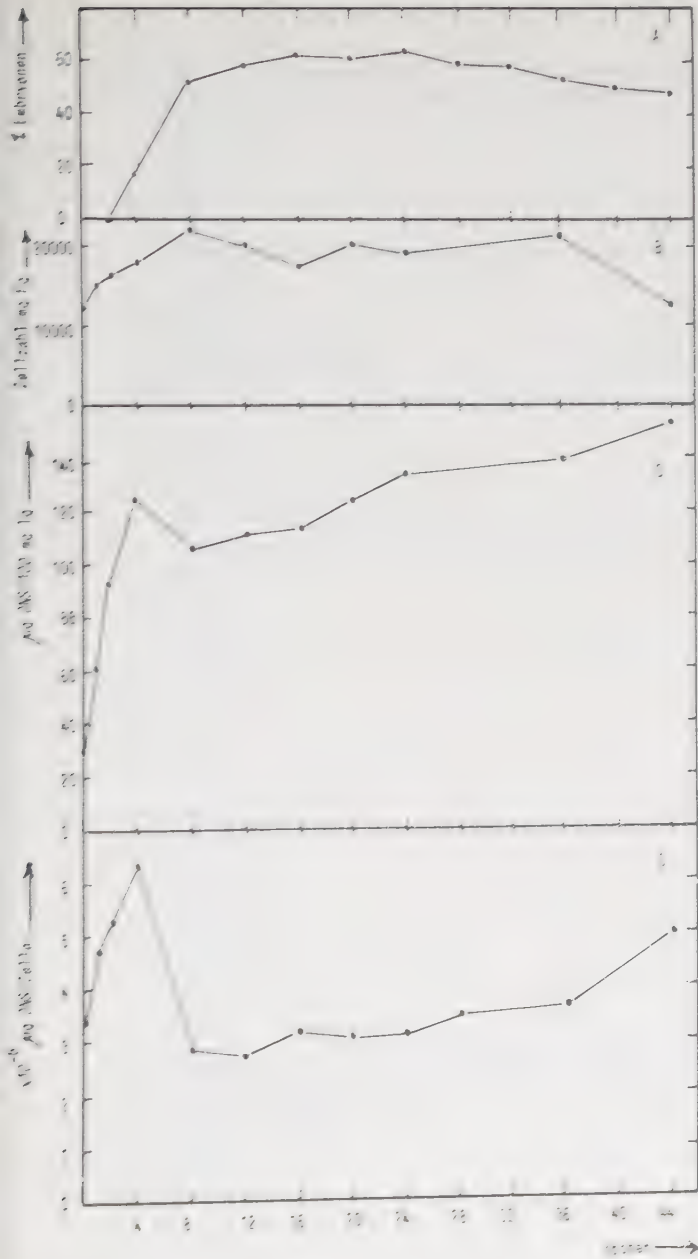


Abb. 1: Vergleichende Beobachtung von Lebewesen, Zellzahl, trockengewichtsmessiger, MS-gehalt Trockengewichtsmessiger und Zelle während der ersten

sechs Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Riba

(Reinigen) A) % Lebewesen B) Zellzahl mg/l C) µg MS/l D) 10⁶ µg MS/Zelle

(a) x 10⁶ µg MS/Zelle (b) Zellzahl mg/l (c) µg MS/l (d) 10⁶ µg MS/Zelle

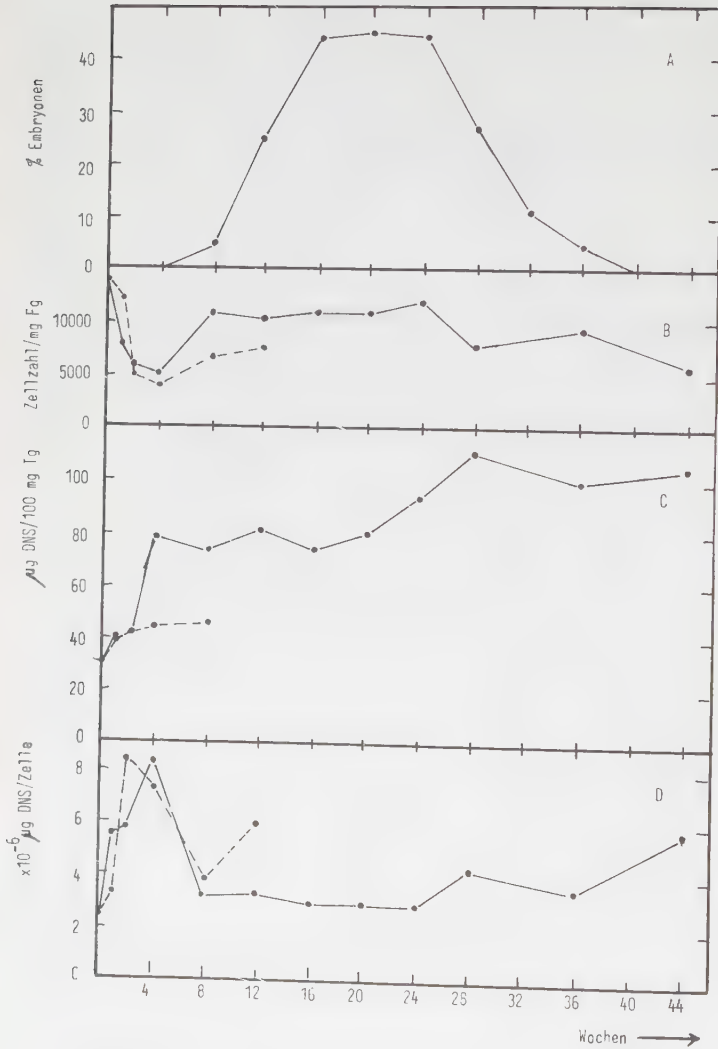


Abb. 21: wie Abb.22 für Stamm F 1

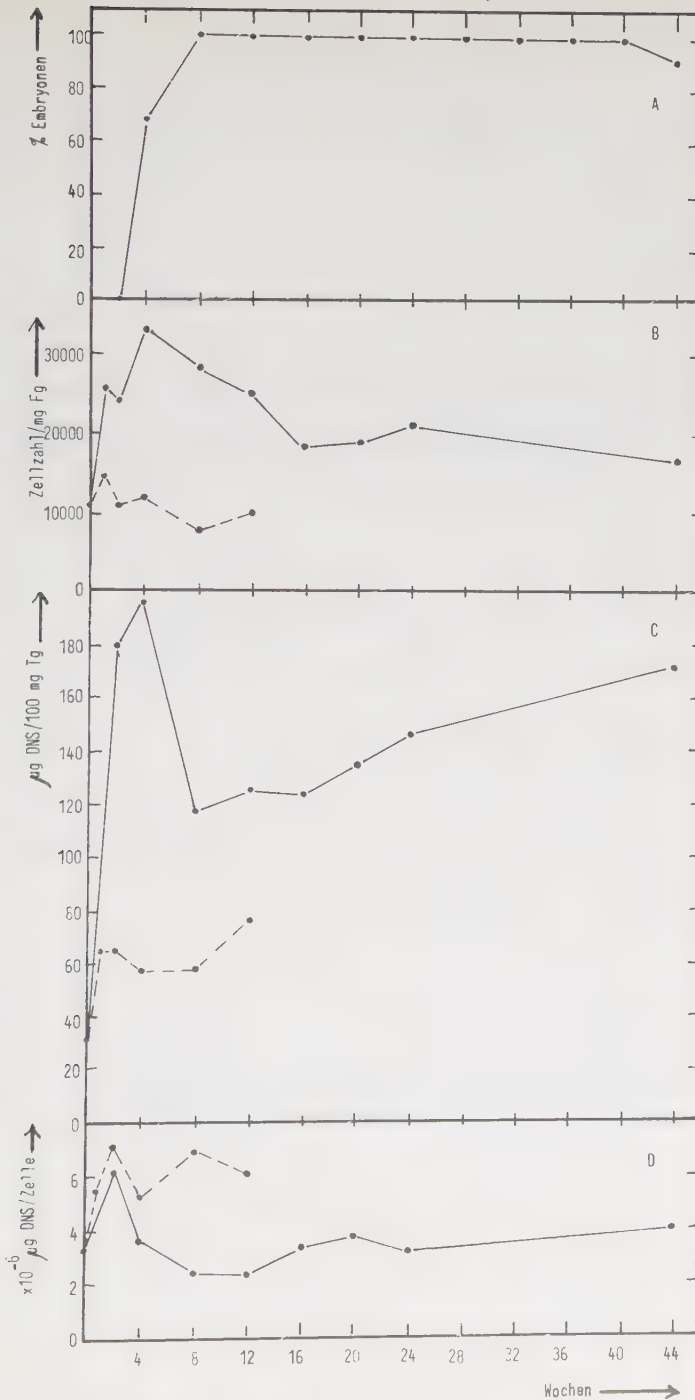


Abb. 24: wie Abb. 22, Stamm F 3

Tab.5: Zellzahl/mg Frischgewicht, μg DNS/Zelle, μg DNS/100mg Trockengewicht und Kulturen mit Embryogenese von den Stämmen F1-4 auf Ms über einen Kulturzeitraum von 44 Wochen nach Isolierung aus der Rübe.

Zeit nach Isolierung	Zellzahl $\times 1000$				μg DNS/100mg Tg				$10^{-6} \mu\text{g}$ DNS/Zelle				%Embryonen			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
0 Wch	14	11	11	12	31	31	30	34	2,5	4,1	3,7	3,7	-	-	-	-
1 "	9	12	26	13	40	48	108	52	5,6	5,1	4,7	3,7	-	-	-	-
2 "	6	8	24	27	41	42	180	113	5,8	5,7	6,2	3,6	-	-	-	-
4 "	5	5	33	27	78	52	197	179	8,3	9,2	3,0	4,7	0	0	68	3
8 "	11	23	28	29	73	85	117	153	3,2	2,8	2,4	3,3	99	100	100	3
12 "	10	16	26	31	81	88	125	116	2,3	3,3	2,3	2,3	27	100	100	7
16 "	11	21	17	20	74	117	124	152	3,0	2,8	3,3	3,7	44	100	100	2
20 "	11	25	19	25	79	116	135	166	3,0	2,7	3,7	2,9	45	100	100	0
24 "	12	21	21	21	93	132	146	164	2,9	3,0	3,2	3,5	44	100	100	10
28 "	8	38	-	-	111	205	-	-	4,4	2,7	-	-	27	100	100	9
32 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	100	100	19
36 "	10	40	-	15	100	128	-	191	3,	1,3	-	5,9	5	100	100	10
40 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	100	100	0
44 "	8	17	17	15	117	172	221	5,9	4,7	4,0	5,7	0	95	92	5	5

stieg der DNS-Gehalt/100 mg Trockengewicht wesentlich stärker an als die Zellzahl/mg Frischgewicht; dies führte in beiden Fällen zu einer Verdopplung bzw. Verdreifachung der Menge an DNS/Zelle, bei Stamm F1 in der 4. Woche, bei F3 schon in der 3. Woche. Danach fiel der DNS-Gehalt/Zelle wieder auf der Karotte entsprechende Werte ab, bei F1 durch Anstieg der Zellzahl, bei F3 durch Absinken des DNS-Gehaltes/Trockengewichtseinheit. Das Niveau von ca. $3 \cdot 10^{-6}$ μ g DNS/Zelle blieb bei vielen Stämmen auf Ms-Medium in dem untersuchten Zeitraum (bis zu 208 Wochen) erhalten (Abb.25). Bei einigen Stämmen stieg der DNS-Gehalt/Zelle im Laufe der Kulturzeit aber an (F1 und F4 zwischen der 24. und 40. Woche, E2 zwischen der 40. und 100. Woche), sodaß bei den Kulturgruppen C und A dann Stämme mit signifikant höherem DNS-Gehalt/Zelle gefunden wurden (z.B. A4, Tab.6).

Auch auf Mw-Medium nahm in den ersten 4 Wochen nach Isolierung der Kulturen die DNS-Menge/Zelle um ca. 100 % zu (Abb.23, 24, 25). Im Gegensatz zu Ms-Kulturen blieb in Mw-Kulturen dieses Niveau aber erhalten, sodaß in älteren Kulturen eine durchschnittliche Menge von $5,6 \cdot 10^{-6}$ μ g DNS/Zelle gemessen wurde. Die Hälfte der Stämme unterschied sich damit signifikant von ihren Parallelstämmen auf Ms. Einige Stämme auf Mw lagen allerdings auch noch signifikant über diesem Wert von $5,6 \cdot 10^{-6}$ (z.B. C1, Tab.6). In keinem Fall trat erhöhter DNS-Gehalt/Zelle bei Stämmen auf Mw und Ms parallel auf; dies bedeutet aber, daß eventuelle Erhöhung des DNS-Gehaltes unabhängig von der Ausgangskarotte ist.

Bei einem Vergleich zwischen DNS-Gehalt der Ms-Kulturen und ihrer Fähigkeit zur Embryogenese ergab sich keine Abhängigkeit der beiden

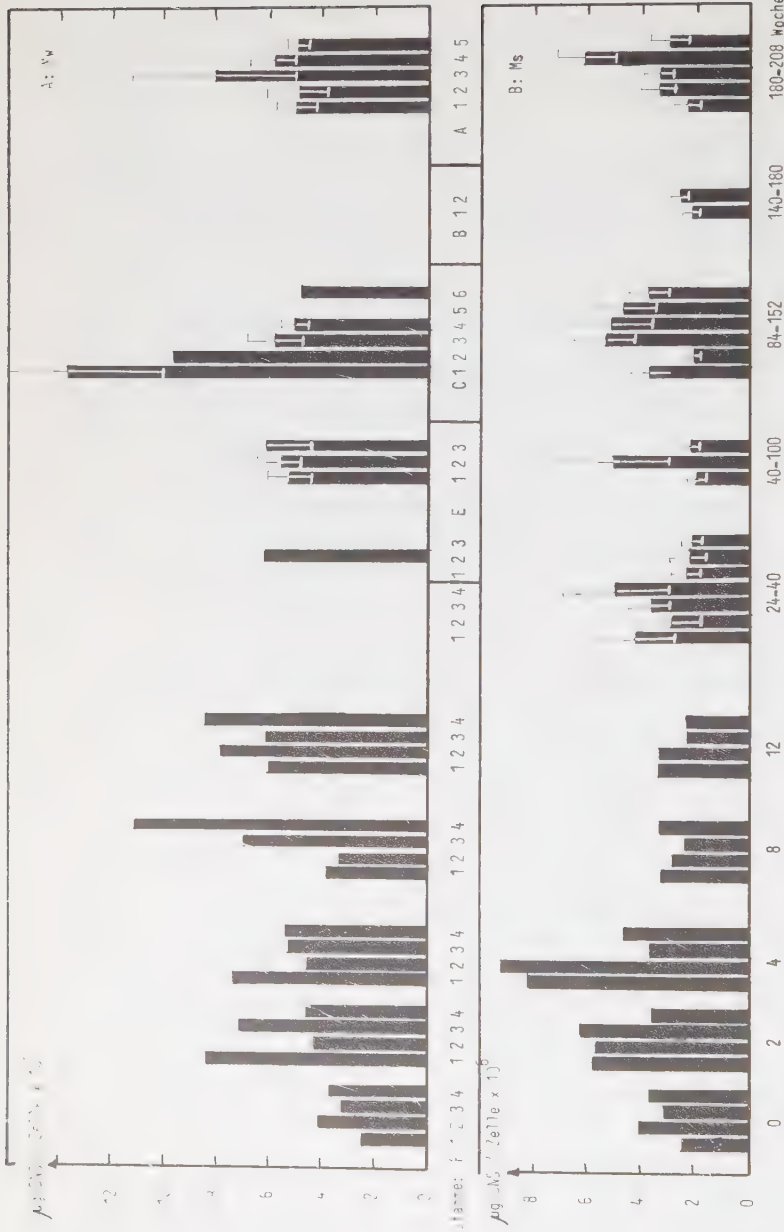


Abb. 25: Abhängigkeit der Menge an DNS / Zelle vom Kulturmedium und der Kulturdauer

A: Kulturen auf M_1 } sich entsprechende Stämme jeweils übereinander aufgetragen
 B: Kulturen auf M_2 }

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rube

0 - 40 Wochen: Stämme F 1 - 4 (2 Bestimmungen je Stamm)

40 - 100 Wochen: Stämme E 1 - 3 (3-9 Bestimmungen je Stamm)

Ordinate: $\times 10^{-6} \mu\text{g DNS/Zelle (mit 95\%-Vertrauensbereich I)}$

84 - 152 Wochen: Stämme C 1 - 6 (1-9 Bestimmungen je Stamm)

140 - 180 Wochen: Stämme B 1 - 2 (3-4 Bestimmungen je Stamm)

180 - 208 Wochen: Stämme A 1 - 5 (5-8 Bestimmungen je Stamm)

Tab.6: Statistischer Vergleich der Kulturgruppen A und C bezgl. ihrer DNS-Mengen / Zelle (nach dem t-Test, PÄTAU 1943).
linkes Dreieck: Vgl. der Mw-Kulturen untereinander
rechtes " : Vgl. der Ms-Kulturen untereinander
Diagonalstreifen: Vgl. der jeweils entsprechenden Stämme von Ms gegen Mw

0 = $p > 0,05$ x = $0,05 > p > 0,01$ xx = $0,01 > p > 0,0027$
xxx = $p > 0,0027$

Stamm	C						A				
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
C 1	xxx	xxx	x	0	0	0	xxx	0	0	xxx	0
2	-	-	xxx	xx	xxx	xx	0	xx	xxx	xxx	x
3	xxx	-	0	0	0	x	xxx	xx	xx	0	xx
4	xx	-	0	0	0	0	xx	0	0	0	x
5	-	-	-	-	-	0	xxx	0	x	x	x
6	x	-	0	0	-	0	xx	0	0	xxx	0
A 1	xxx	-	0	0	-	0	xxx	x	xx	xxx	0
2	xxx	-	0	0	-	0	0	x	0	xxx	0
3	x	-	0	0	-	0	x	x	xxx	xx	0
4	xxx	-	0	0	-	0	0	0	0	0	xxx
5	xxx	-	0	0	-	0	0	0	xx	0	xxx

Tab.7: Korrelationen (r) zwischen prozentualem Zuwachs an Frischgewicht (a), prozentualem Anteil von Trockengewicht am Frischgewicht (b), Zellzahl / mg Frischgewicht (c), μ g DNS/Zelle (d), % Kulturen mit Embryogenese (nach dem Umsetzen von Mw auf Ms) (e) und % Kulturen mit Rhizogenese (f) der Mw-Kulturen C1-4 und A2-5 (r wurde berechnet nach der Formel von Abb.5; (xx) bedeutet, daß die Korrelation signifikant ist mit $p < 0,01$ nach dem t-Test).

$r(a,b) = -0,90$ (xx)	$r(c,d) = -0,58$	$r(d,e) = 0,18$
$r(a,f) = -0,22$	$r(c,e) = 0,33$	$r(d,f) = -0,55$
$r(b,c) = 0,26$	$r(c,f) = 0,90$ (xx)	$r(e,f) = 0,16$

Größen voneinander. Ein hoher Prozentsatz der Stämme (69 %) lag mit seinem DNS-Gehalt/Zelle weiterhin unter $4 \cdot 10^{-6}$ ug (Abb.25), nachdem die Embryobildung beendet war.

Auch zwischen DNS-Gehalt/Zelle und Wurzelbildung bei Mw-Kulturen ergab sich keine Korrelation (Abb.26, Tab.7). So zeigte A3 trotz hohen DNS-Gehaltes gute Wurzelbildung (60%), während C3 bei normaler DNS-Menge/Zelle keine Wurzeln aufwies. Der Korrelationskoeffizient (Tab.7) lag deshalb nur bei -0,55 und war nicht signifikant.

Ähnliche Ergebnisse wurden beim Umsetzen der Mw-Kulturen auf Ms erzielt (Abb.26, Tab.7).

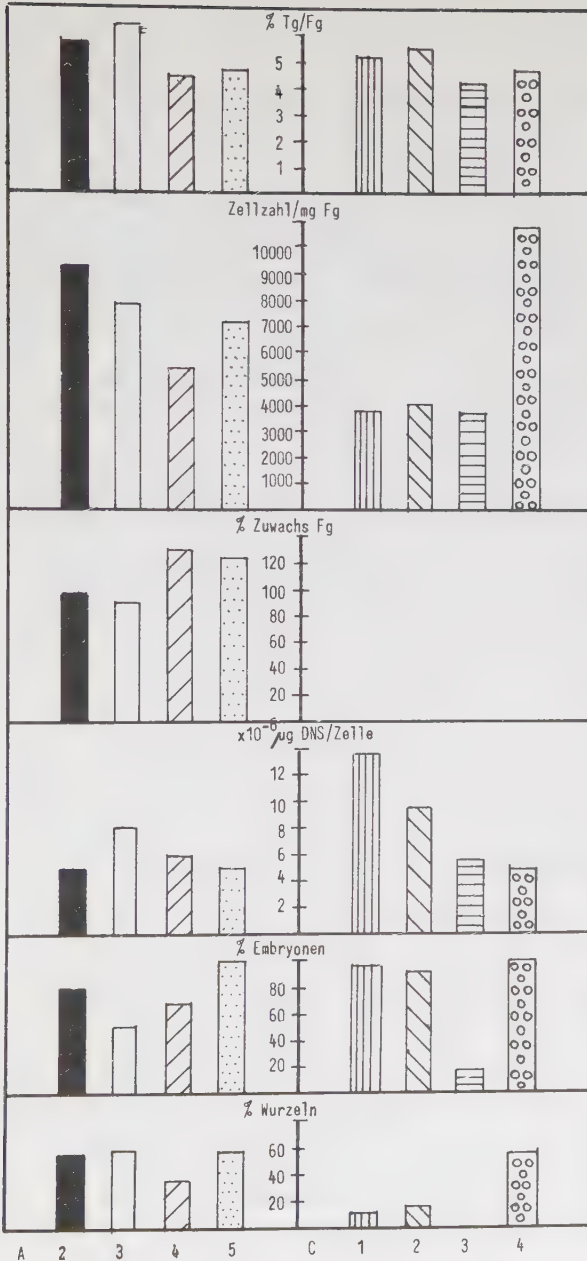


Abb. 26 : Vergleich von % Trockengewicht/Frischgewicht, Zellzahl/mg Frischgewicht, % Zuwachs Frischgewicht, µg DNS/Zelle, % Kulturen mit Embryogenese (nach Umsetzen von Mw auf Ms) und % Kulturen mit Wurzelbildung von den Mw-Kulturen C1-4 und A2-5.

DISKUSSION

Der von REINERT et al. (1968; 1970) in Erwägung gezogene Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Morphogenesekapazität von Karottengewebekulturen wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht, vor allem die Embryogenese, teils auch die Rhizogenese. Die Parameter für das Wachstum waren Gewichtszunahme der Zellkulturen und Zellteilungsaktivität.

Schon REINERT und TAZAWA (1969) berichteten über Schwierigkeiten mit sehr unterschiedlich reagierenden Karottengeweben. Bezüglich des Wachstums war dies ebenfalls festzustellen. Daher erschien es meist nicht sinnvoll, Mittelwerte über alle Stämme zu bilden, sondern die Werte für die Stämme einzeln anzugeben und daraus den Trend abzuleiten (Abb.1, 4, 6, 7). Um einen Anhalt für die Schwankungsbreite des Frischgewichtszuwachses zu erhalten, wurden die 95%-Vertrauensbereiche errechnet (Tab.3). Sie lagen im Bereich von ± 8 bis 20 %. Diese große Streubreite ist vor allem auf unvermeidbare Wägefehler zurückzuführen, da das Gewebe schon nach wenigen Subkultivierungsperioden sehr weich und wasserreich war.

Bei der Bestimmung der Zellzahl lag die Schwierigkeit in der heterogenen Zusammensetzung der Explantate, besonders während der ersten 20 Wochen der Kultivierung. In diesem Zeitraum bestanden die Explantate aus festgefügttem Rübenausgangsgewebe (Xylem, Kambium, Phloem), leicht zerfallendem dünnwandigen Kallus und kleinzelligen embryonalen Gewebekomplexen. Die schonende

Mazeration mit nur 5%iger Chromsäure über 24 Stunden (NEUMANN et al. 1968, sowie SYONO 1965a verwendeten 10%ige Chromsäure und 10%ige HCl im Verhältnis 1:1) gewährleistete ein Zerfallen der festeren Gewebe in überschaubare Zellgruppen ohne Zerstörung der zarteren Kalluszellen. Außerdem wurde statt der sonst üblichen Zählkammer für Blutzellen von nur 0,1mm Tiefe eine größere Kammer (Tiefe 0,8mm) benutzt, in der sich auch Zellen und Zellgruppen von über 100 μ Größe unbehindert gleichmäßig verteilen konnten. Ebenfalls wurde die Partikeldichte in der Kammer so hoch gehalten, daß bei jeder Zählung ein repräsentativer Anteil auch der größeren Zellgruppen erfaßt werden konnte.

Das Wachstum von Gewebeexplantaten in den ersten 4 Wochen nach Isolierung aus der Pflanze ist schon von verschiedenen Autoren quantitativ untersucht worden (LINSER et al. 1968; YEOMAN et al. 1965; STEWARD et al. 1964). Jedoch lassen sich die Ergebnisse, auch wenn ebenfalls Karotten benutzt wurden, nur schwer mit denen anderer Versuchssysteme vergleichen, da Ausgangsorgane, Varietäten, Basalmedien und sonstige Kulturbedingungen sehr unterschiedlich sind.

Wurden in unserem Versuchssystem Explantate von ca. 30 mg auf die Medien Ms und Mw verbracht, so nahm das Frischgewicht in den ersten 4 Wochen um das 7-10-fache zu (Abb.1). Diese Zunahme ist anscheinend stark vom Anfangsgewicht der Explantate abhängig: so erhielt CAPLIN (1963) bei 30-mg-Einwaage einen 8-fachen Zuwachs, bei 2-mg-Einwaage dagegen einen 36-fachen. Nach CAPLIN soll diese Differenz durch das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bedingt sein.

Die Frischgewichtszunahme kam auch durch Zellteilung zustande, da auf beiden Medien eine Zunahme der Zellen/Explantat zu beobachten war. Sie entsprach einer durchschnittlichen Zahl von 1,3 bis 5 Generationen / 4 Wochen (Abb.11). Der Durchschnittswert gibt allerdings nicht die tatsächliche Teilungsintensität der einzelnen Zellen wieder, da/nicht alle Zellen des Explantates daran beteiligt waren. Nach DANILINA et al. (1965) und NEUMANN (1969) vermehren sich zwar Zellen aller drei Gewebe eines Explantates (Phloem, Kambium, Xylem; letzteres in geringerem Maße), zunächst aber nur die oberflächen-nahen Zellschichten. Außerdem teilen sich kambiumnähere Phloemzellen früher als die weiter peripher liegenden (CAPLIN 1964). So wurde auch für Explantate aus der Knolle von *Helianthus tuberosus* festgestellt, daß die Zellen im Innern zunächst mitotisch inaktiv bleiben (YEOMAN et al. 1965). Bei vergleichenden Betrachtungen liefert die Zunahme der Gesamtzellzahl/Explantat genügend Anhaltspunkte für die Beurteilung der Zellteilungsaktivität und wird in gleicher Weise auch von anderen (LINSER et al. 1968; MELCHERS et al. 1958) Autoren dafür herangezogen. Die Zellteilungsaktivität lag in den ersten 4 Wochen im Mittel bei Mw zwar etwas niedriger als bei Ms, aber es gab auch Stämme, die auf Ms und Mw gleich schnell wuchsen (Abb.27: F2, E1).

Neben der Zellteilung war aber auch die Zellstreckung am Zuwachs der Explantate beteiligt. Die Gewebestücke zeigten sowohl auf Mw als auch auf Ms nach 4 Wochen einen deutlich erhöhten Wassergehalt. Während das genuine Karottengewebe knapp 87% Wasser enthielt, betrug der Wassergehalt bei Mw-Kulturen 89%, bei Ms-Kulturen

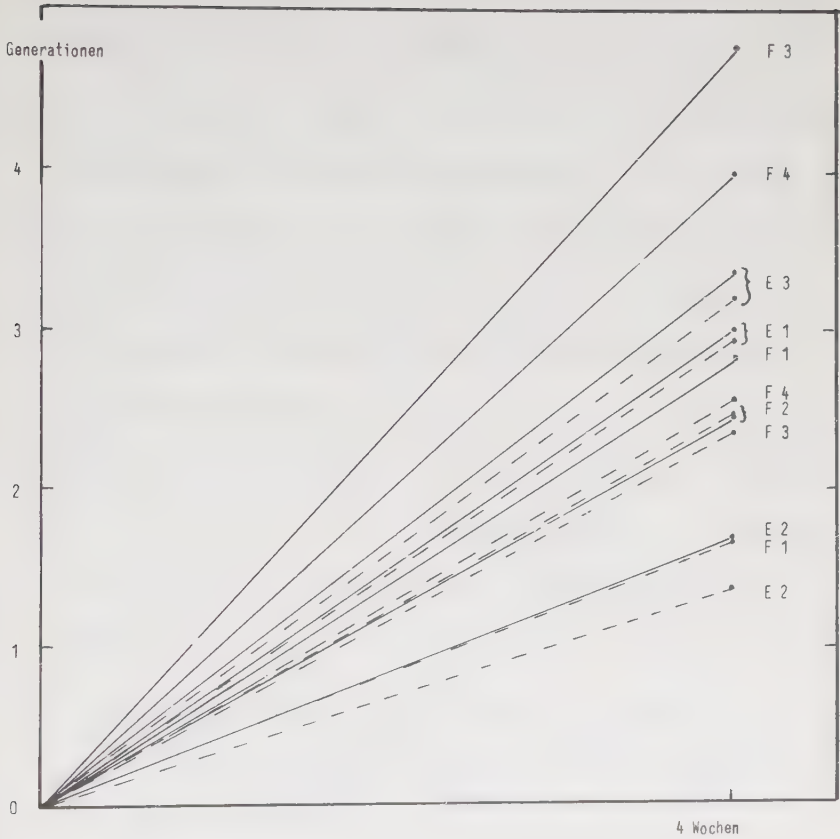


Abb.27 : Durchschnittlich durchlaufenen Zellgenerationen von Karottenexplantaten (Stämme E1-3, F1-4)

in den ersten 4 Wochen nach Isolierung auf Ms (—) und Mw (---) bei 28°C

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

Ordinate: durchlaufene Zellgenerationen, vgl. Abb. 11

sogar 93 % (Abb.4). STEWARD (1961) gibt für seine Phloemexplantate einen Anstieg von 90 auf 95 % Wasser an. Bei Mw blieb trotz Zellteilung das Frischgewicht pro Zelle gleich oder nahm sogar zu (Abb.6, 7). Auf Ms wurden bei einigen Stämmen die Zellen schwerer und größer, bei zwei Stämmen allerdings deutlich kleiner (F3, F4) als die Zellen des Ausgangsgewebes. In diesem Fall dürften sich die Zellen schneller geteilt als gestreckt haben. In Übereinstimmung mit den Angaben von NEUMANN (1965) bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen Zellteilungsaktivität und Zellgewicht. Auf Ms war die Abnahme der Zellgröße bei allen Stämmen spätestens nach der 12. Woche deutlich ausgeprägt, bei einem sogar schon nach einer Woche. Bei Mw war die Abnahme der Zellgröße geringfügiger und erst nach 32 Wochen feststellbar.

Mit Zunahme der Zellzahl/mg Frischgewicht stieg auch der DNS-Gehalt/100 mg Trockengewicht (Abb. 22-24). Doch nahm der DNS-Gehalt sogar stärker zu als die Zellzahl, und zwar bis zur doppelten DNS-Menge/Zelle. Da der DNS-Gehalt/Zelle nach 4-8 Wochen wieder auf den Ausgangswert abgesunken war, kann die Zunahme durch die starke Zellteilungsaktivität in den ersten 4 Wochen bedingt sein. Es befinden sich offenbar so viele Zellen gleichzeitig in der späten DNS-Synthesephase (S) oder Nach-Synthesephase (G2), daß der durchschnittliche DNS-Gehalt/Zelle einer Tetraploidie (4C) entspricht. Über Akkumulation von DNS am Beginn aktiver Zellteilung berichten auch STEWARD et al. (1964) bei der Zellteilung von Karottenexplantaten, sowie SHORT, BROWN and STREET (1969) bei Acer-Suspensionskulturen. Voraussetzung dafür ist allerdings eine Synchronisation der Zellteilung, die für Acer-Suspensionen auch nachgewiesen wurde

(STREET 1967). Gleichfalls kann bei Primärexplantaten aus ruhendem Speichergewebe, also auch dem der Karotte, mit einer Synchronisation der Zellen gerechnet werden, wenn sie auf ein Nährmedium übertragen werden. Das zeigten YEOMAN et al. (1966) für Helianthus-Explantate: Zellen befinden sich zum Zeitpunkt der Explantation in der Prä-Synthesephase (G1) und beginnen nach einer lag-Phase gleichzeitig mit der DNS-Synthese. Da sich (nach MATTHYSSE and TORREY 1967) mitotisch ruhende Zellen meist in der G1-Phase befinden, dürften sich die Explantate der Karotte ähnlich wie die von Helianthus verhalten.

BEIER (1969) fand, daß neben der gesteigerten DNS-Synthese die Kulturen auch an RNS und Protein zunahmen, und zwar Ms-Kulturen stärker als Mw-Kulturen. Unter der Voraussetzung, daß die Kulturen von BEIER und dieser Arbeit ähnliches Wachstum aufweisen, ergibt sich, daß RNS und Protein stärker zunehmen als die Zellzahl (Tab.8)

Tab.8: Zunahmefaktoren von Zellzahl, RNS, Protein, DNS, Frischgewicht und Trockengewicht pro Explantat zwischen Isolierung und 2 Wochen sowie 2 und 4 Wochen Kultivierung auf Ms und Mw (Werte mit* nach BEIER 1969).

	0-2 Wochen		2-4 Wochen	
	Mw	Ms	Mw	Ms
Zellzahl	3,5	7,1	1,7	1,9
Fg	4,2/4,8*	5,6/5,0*	1,8/1,5*	2,0/1,5*
Tg	4,0/3,7*	4,1/3,0*	1,5/1,3*	1,7/1,2*
Protein	4,2*	9,8*	1,1*	1,5*
RNS	9,3*	13,7*	1,4*	1,6*
DNS	5,9/7,1*	11,6/11,1*	1,5/1,5*	2,1/1,6*

Der starke Zuwachs der Explantate, die Verkleinerung der Zellen (bei Ms) und die erhöhte Stoffwechselaktivität zeigen an, daß zumindest ein Teil der Explantat-Zellen in den ersten Wochen nach Isolierung aus der Rübe eine Dedifferenzierungsphase durchläuft. Die fertig ausdifferenzierten und mit Ausnahme der Kambiumteile mitotisch ruhenden Phloem- und Xylemzellen erlangen ihre Teilungsfähigkeit wieder und verlieren nach mehreren schnell aufeinanderfolgenden Mitosen ihre typische Funktion und Gestalt. Dieser Prozeß der Embryonalisierung erwachsener pflanzlicher und auch tierischer Zellen wurde von vielen Autoren in gleicher Weise beschrieben (STANGE 1965; HOLTZER et al. 1966; LINSER et al. 1968; REINERT 1968; HALPERIN 1969). Bei Karottenexplantaten entstand ein Kallus, der aus kleinen, rundlichen, plasmareichen neben größeren parenchymähnlichen Zellen bestand. Die heterogene Zellzusammensetzung ist vielleicht damit zu erklären, daß sich junge lignifizierte Zellen und unreife Siebröhren nicht völlig dedifferenzieren können (HALPERIN 1969). Solche Zellen wachsen und teilen sich zwar noch, und verändern damit die Gewebestruktur des Ausgangsexplantates, sind aber wahrscheinlich nicht mehr zur Organogenese befähigt. Dies gilt allerdings nicht generell für Parenchymzellen, die sich durchaus noch weiter dedifferenzieren können und dann auch Embryonen bilden (BACKS -HÜSEMAN und REINERT 1970).

Bei der Auslösung des Dedifferenzierungsprozesses spielt die Verwundung von Zellen durch das Herausschneiden der Explantate sicher eine bedeutende Rolle. Das ist schon daraus ersichtlich, daß kleinere Explantate mit relativ größerer Oberfläche und damit mehr verletzten Zellen relativ schneller wachsen

(CAPLIN 1963; YEOMAN et al. 1968). HACCIUS et al. (1964) schreiben ebenfalls den stofflichen Einflüssen, die von strahlengeschädigten Zellen ausgehen, einige Bedeutung für organisierte Neubildungen zu. Günstig für die Initiierung des Wachstums scheint es auch zu sein, daß die Explantate einem Speichergewebe entstammen, das mehr Nitrat, Ammonium und lösliche Proteine enthält als später die Kalli auf Mw (TAZAWA et al. 1969). Dies mag ein weiterer Grund dafür sein, daß das Wachstum bei verschieden hohem Stickstoffangebot im Medium (Ms und Mw) in den ersten 4 Wochen nicht so unterschiedlich ist wie in späteren Kultivierungsperioden. Ob Wuchsstoffzugabe zum Medium in den ersten Tagen der Kultivierung nötig ist, erscheint fraglich. Karottenexplantate, die nur in destilliertem Wasser kultiviert wurden, nehmen nämlich in den ersten 4 Tagen an Frischgewicht zu und synthetisieren Protein (MACDONALD et al. 1961; AP REES et al. 1971). BRYANT et al. (1971) stellten RNS- und DNS-Synthese in Karottenexplantaten nach 48 - 72 Stunden fest, ohne daß Nähr- oder Wuchsstoffe zugesetzt wurden; Zugabe von verschiedenen Wuchsstoffkombinationen (Kinetin und IES) und Nährmedien änderten nichts. Die wenigen Bakterien, die in allen Karottenexplantaten vorhanden sind, sind für diese Stoffwechselreaktionen wahrscheinlich nicht verantwortlich zu machen (WILDES et al. 1971). YAMADA and YASUDA (1971) dagegen führen die einsetzende DNS-Synthese bei der Kallusinduktion an Erbsenepikotyl-Segmenten auf die Wirkung von 2,4-D zurück. Sie stellten fest, daß 2,4-D mit den lysinreichen Histonen Komplexe bildet. Sie folgerten daraus, daß 2,4-D die Depression der DNS-Polymerase aufhebt.

Da bisher keine Ergebnisse über kontinuierlich langfristiges Verhalten von Gewebekulturen unter gleichbleibenden Bedingungen vorliegen außer den Angaben von REINERT et al. (1970) über die Morphogenese der Karottenkulturen, wurden nun in der vorliegenden Arbeit die Kulturen über 4 Wochen hinaus weiter bezüglich ihres Wachstums untersucht und damit die Morphogenese-Beobachtungen ergänzt.

Nach dem starken Zuwachs und der hohen Zellteilungsrate in den ersten 4 Wochen (Abb.1, 11) auf Ms wie auch auf Mw zeigte sich ein deutlicher Wachstumsrückgang in den weiteren 8 Wochen, der bei einigen Mw-Kulturen fast zum Wachstumsstillstand führte. Bei Ms-Kulturen nahm der Frischgewichtszuwachs jedoch bald wieder zu und pendelte sich nach 44 Wochen auf einen konstanten Wert (ca. 350%) ein. Mw-Kulturen benötigten fast 80 Wochen, bis der Zuwachs gleichmäßig bei ca. 100 % / 4 Wochen lag. Diese Werte entsprechen ungefähr den Angaben von REINERT et al. (1970). Auch DE TOROK and RODERICK (1962) stellten bei *Picea glauca* - Tumoren und normalen Gewebekulturen ein langsames Ansteigen des Wachstums fest, bei normalem Gewebe ebenfalls nach einem zwischenzeitlichen Rückgang. Durch Explantieren auf wuchsstoffhaltiges Medium werden die Ausgangsgewebe drastischen Änderungen unterworfen, auf die sie mit hoher Stoffwechselaktivität und Wachstum reagieren. Spätestens nach 8 Wochen ist dieser starke Reiz abgeklungen. Einerseits sind nun die im Explantat ursprünglich vorhandenen Speicherstoffe weitgehend aufgebraucht, wie z.B. reduzierter Stickstoff und lösliche Proteine bei Mw-Kulturen (TAZAWA et al. 1969), - andererseits sind die Kulturen offensichtlich noch nicht dem

Medium angepaßt, sodaß das Wachstum gegenüber den ersten 4 Wochen abnimmt. Der nun einsetzende Adaptationsprozeß führt bei Ms früher als bei Mw zu einem "steady state" des Wachstums, wie es auch von Wurzelkulturen berichtet wird (STREET 1966). Bei der Adaptation ist z.T. sicher auch die Induktion von Enzymen entsprechend den Komponenten des Mediums beteiligt (MATHES et al. 1971). Da Mw wegen seines geringen Stickstoff- und Kaliumgehaltes und wegen des völligen Fehlens von reduziertem Stickstoff ein weitgehend unzureichendes Medium darstellt (STREET et al. 1966; REINERT 1965), ist es verständlich, daß die Adaptation länger dauert und sich das Wachstumsgleichgewicht auf einer niedrigeren Stufe einstellt.

Neben quantitativen Wachstumsveränderungen ergaben sich vor allem aber morphogenetische Leistungen der Kulturen. Ms-Kulturen brachten von der 4.-8. Woche an Embryonen hervor, Mw-Kulturen von der 8.-12. Woche an Wurzeln (Abb. 13, 20). Geschwindigkeit und Ausmaß der Dedifferenzierung in den ersten 4 Wochen waren offensichtlich ausschlaggebend für Beginn und Stärke der Embryogenese auf Ms. Kulturen, deren Zellen sich in den ersten 4 Wochen mehr streckten als teilten (F1, F2; Abb.23; Tab.5), zeigten erst nach 8 Wochen Embryonen; Stamm F3 dagegen (Abb.24) besaß schon nach 8 Tagen wesentlich kleinere Zellen und wies dementsprechend schon nach 4 Wochen bei 69% der Explantate Embryonen auf. Nach 8 Wochen waren diese durch die Rübe bedingten Unterschiede aber ausgeglichen; F2 und F3 bildeten nun zu 100 % Embryonen, obwohl sie sich in den ersten 4 Wochen völlig verschieden verhalten hatten. In den folgenden Wochen spiegelten die Zellzahlen/mg Frischgewicht die Morphogenesekapazitäten wieder. Von der 12. bis zur

28. Woche waren die Zellen im Durchschnitt am kleinsten (Abb.7), da die Kulturen zu einem großen Teil aus embryonalen Zentren, Pro-embryonen und fertigen Embryonen bestanden. Stämme, die nicht in allen Explantaten Embryonen trugen und auch zu einem größeren Teil parenchymatische Zellen enthielten (F1), erreichten dementsprechend auch nicht so hohe Zellzahlen/mg Frischgewicht. Mit abnehmendem Prozentsatz embryobildender Kulturen nahm auch die Zellzahl/mg Frischgewicht ab, da die Kulturen mehr und mehr nur noch aus parenchymatischen Zellen bestanden. Außer durch die Zellgröße war diese Entwicklung auch durch Änderungen des Wassergehaltes gekennzeichnet (Abb.4). Der Wassergehalt nahm auch nach den ersten 4 Wochen noch kontinuierlich zu, da der Anteil ursprünglicher Explantatzellen an der Kallusbildung wuchs. Mit Nachlassen der Embryobildung stieg der Wassergehalt weiter (97-98%), da sich die Gewebe nunmehr fast ausschließlich aus vakuolisierten, plasmaarmen, dünnwandigen Parenchymzellen zusammensetzten. Somit ist die oben beschriebene steigende Zunahme an Frischgewicht je 4 Wochen zwischen der 20. und 60. Woche auch auf vermehrte Wasseraufnahme zurückzuführen.

Die Rhizogenese der Mw-Kulturen prägt die zelluläre Zusammensetzung der Kulturen nicht so stark wie die Embryogenese, da selten alle Explantate Wurzeln tragen und der Anteil der embryonalen Zentren am Gesamtgewebe nur gering ist. Im Zeitraum der optimalen Wurzelbildung (20.-68. Woche; Abb.20) sind aber auch die Zellen bei Mw-Kulturen etwas kleiner (Abb.7). Der Anteil des Trockengewichtes nimmt auch hier entsprechend der Kallusentwicklung ab (Abb.4), allerdings nicht so rasch wie bei Ms-Kulturen, da sie langsamer wachsen. Ab der 40. Woche liegt der Wassergehalt konstant bei

94 -95 %, bleibt also unter dem der Ms-Kulturen. Da der Proteinanteil am Frischgewicht der Mw-Kulturen kleiner ist als bei Ms-Kulturen (TAZAWA and REINERT 1969; BEIER 1969), besteht der höhere Trockengewichtsanteil wohl überwiegend aus Zellwandsubstanz, eventuell auch aus Farbstoffen. Während in Mw-Kulturen auch lignifizierte, tracheidenähnliche Zellen gefunden wurden (Abb.19A), traten solche bei Ms-Kulturen nie auf. Möglicherweise liegt dies am geringeren Ca-Gehalt des Mw-Mediums: Mw enthält 1,2 mM Ca, Ms 3,0 mM (LIPETZ 1962). Außerdem enthalten Mw-Kulturen mehr Carotin als Ms-Kulturen, wie bei Extraktion der Gewebe mit Methanol festgestellt wurde. Dies war vielleicht durch die herabgesetzte Proteinsynthese als Folge des geringen Stickstoffangebotes bedingt. Nach PAECH (1957) werden hierdurch Kohlenstoffgerüste für die Carotinoidsynthese frei.

Das unterschiedliche Verhalten bei der Morphogenese auf Mw und Ms ist schon mehrfach beschrieben worden (REINERT 1967; REINERT et al. 1968; REINERT et al. 1970) und kann als gesichert angesehen werden.

Embryonen können aus einzelnen Zellen so entstehen, daß sich eine Kalluszelle durch vielfache Zellteilung über einen proembryonalen Zellkomplex mit Suspensorzellen zu mehreren Embryonen entwickelt (BACKS-HÜSEMANN und REINERT 1970). Offenbar waren aber nicht alle Kalluszellen zum Zeitpunkt der Untersuchung (ca. 20 Wochen alte Kulturen) imstande, Embryonen zu bilden, da sich nur 6 von 82 untersuchten Einzelzellen in der beschriebenen Weise verhielten. Es ist nicht sicher, ob die Embryobildung aus Karottenrübenexplantaten nur über Kalluszellen ablaufen kann, denn KATO (1968)

wies nach, daß Embryonen aus Epidermis von Karottenkeimling-Hypokotyl direkt entstehen. Allerdings traten bei Rübenexplantaten Embryonen immer erst dann auf, wenn schon Kallus gebildet worden war. Im Gegensatz zur Entstehung der Proembryonen verlief die Weiterentwicklung der globulären Stadien über Herz- und Torpedoform ebenso wie bei der zygotischen Embryogenese (Abb.12; BORTHWICK 1931; BACKS-HÜSEMANN et al. 1970). Teilweise auftretende Mißbildungen der Embryonen sind wohl auf die Wirkung des 2,4-D zurückzuführen (HACCIUS 1955).

Über den Ursprung der Wurzelregenerate bei Karotten ist bisher wenig bekannt. Übereinstimmende Aussagen liegen darüber vor, daß embryonale Zentren endogen im Kallus entstehen, jedoch nicht so scharf von diesem abgegrenzt sind wie die Proembryonen (Abb.19B; HALPERIN 1966b). Bei histologischen Untersuchungen stellte sich heraus, daß Wurzelzentren oft aus Tracheiden bestanden, die von einem Kambiumring umgeben waren.(STEWART et al. 1958; GAUTHERET 1957). Kambium und Leitgewebe sind offensichtlich notwendige Differenzierungen vor der Anlage von Wurzelprimordien (GAUTHERET 1969).

Es erhebt sich nun die Frage, ob spezifische Faktoren eine bestimmte Differenzierung (Rhizogenese oder Embryogenese) auslösen. Die beiden Medien Ms und Mw unterscheiden sich nur in der mineralischen Zusammensetzung. So enthält das embryoneninduzierende Medium Ms den Stickstoff auch in reduzierter Form (Ammonium), Mw aber nur Nitrat. In ähnlicher Weise wie in den hier beschriebenen Versuchen erhielt HALPERIN (1966b) bei einer Vorkultur von Karottenkalli in Nitratmedium hauptsächlich vakuolisier- te Parenchymzellen, nach Entzug des Auxins nur Wurzeln, nach

Vorkultur mit Ammoniummedium aber Embryonen. Er schloß daraus, daß NH_4 -Ionen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Embryogenese spielen. Andererseits ist aber erwiesen, daß dieser Befund keinen Anspruch auf generelle Gültigkeit hat, da Erhöhung der Nitratkonzentration in Mw oder Ersetzen des Ammoniums durch Nitrat in Ms ebenfalls zur Embryogenese führen (REINERT et al. 1966; 1967; REINERT und TAZAWA 1969; TAZAWA and REINERT 1969). Auch Embryonen aus Tabakpollen entstehen ohne Ammoniumzusatz zum Medium (NITSCH 1969).

Mw unterscheidet sich aber in fast allen Ionenkonzentrationen von Ms; daher ist es durchaus auch möglich, daß die Konzentrationsverhältnisse der Salze untereinander entscheidend sind bzw. sich über die Änderung der Permeabilität gegenseitig beeinflussen, wie das für K^+ und NH_4^+ von TAZAWA and REINERT (1969) erwogen wurde.

Unterschiedliche Salzzusammensetzung der Medien entscheidet aber nicht allein über die Differenzierungsform. Entfernung des Auxins vom Medium hebt nämlich die Alternativität von Wurzel- oder Embryogenese auf. Sowohl Ms- als auch Mw-Kulturen bilden nach Entzug des 2,4-D Wurzeln und Embryonen (REINERT et al. 1970). Daraus folgt, daß die Konzentrationsverhältnisse von Stickstoff zu Auxin für das Morphogeneseverhalten verantwortlich sind (REINERT et al. 1968; REINERT und TAZAWA 1969). Daß durch unterschiedliche Konzentration bestimmter Stoffe die Morphogenese verschieden abläuft, ist auch schon in anderen Versuchssystemen festgestellt worden. So konnten SKOOG and MILLER (1957) an Tabakgeweben, DOERSCHUG and MILLER (1967) an Lactuca je nach Kinetin- und Auxinkonzentration Sprosse oder

Wurzeln induzieren. BONNETT and TORREY (1965) regulierten an Convolvulus-Wurzelsegmenten allein durch den Auxinspiegel die Sproß- oder Wurzelbildung.

LINSER et al. (1968) schreiben die Wirkung der verschiedenen Zusätze zum Medium auf die Morphogenese einer Beeinflussung der Zellteilungsraten zu. Sie nehmen an, daß auf eine Periode intensiver Zellteilung eine Verlangsamung der Zellvermehrung folgen muß, damit die Differenzierung eintreten kann. Sie zogen zur Stützung ihrer These auch Ergebnisse mit anderen Versuchssystemen heran: Es entstanden erst dann Embryonen, wenn dem Medium entweder Auxin entzogen wurde (HALPERIN 1966b), wenn die Kulturen von KOM-haltigem Medium auf synthetisches, auxinfreies übertragen wurden (REINERT 1959), oder wenn Zellen aus dem Kallusverband gelöst wurden (STEWART et al. 1964). Diese Deutung würde auch mit der Meinung von HACCIOUS et al. (1965) übereinstimmen, die eine Ablösung von "kallusfördernden" Bedingungen durch differenzierungsfördernde für die Induktion der Embryogenese postulieren. Wie aber sind die Morphogeneseerscheinungen zu erklären, die ohne Wechsel des Mediums zustande kommen, wenn z.B. Auxonkonzentration (Ms, Mw) oder Glucosekonzentration (HOMES 1967) in Bereichen liegen, die sowohl Kallusbildung als auch Morphogenese fördern? Die Notwendigkeit einer ausgeprägten Dedifferenzierungsphase für die darauf folgende Differenzierung zeigen auch die hier beschriebenen Ergebnisse (S. 65 und 68). Offenbar ist dabei für die Wurzelbildung nur eine niedrigere Stufe der Reembryonalisierung der Zellen erforderlich als für die Embryogenese, da die Zellen relativ groß bleiben; dies gilt sowohl für die hier beschriebenen Mw-Kulturen als auch für

die wurzelbildenden, NO_3^- -vorbehandelten Kulturen von HALPERIN (1966b). Demnach wäre der Zustand der Zellen am Ende der Dedifferenzierungsphase ausschlaggebend für die Richtung der nachfolgenden Morphogenese. Auch bei der Embryogenese von Pollen ist das Entwicklungsstadium wichtiger als das Medium (NITSCH 1969). Es ist jedoch fraglich, ob die Morphogenese erst dann einsetzt, wenn die Zellteilungsaktivität abnimmt. Eine Zunahme der Zellgröße, wie sie NEUMANN (1965; 1969) beschreibt, wurde vor der Rhizogenese auf Mw und der Embryogenese auf Ms zumindest nicht beobachtet (Tab.9), und der Stamm F3 z.B. bildete schon nach 4 Wochen Embryonen, obwohl die Zellteilungsintensität zwischen der 2. und 4. Woche eher zunahm als abnahm (Abb.28). Es ist aber durchaus möglich, daß die widersprüchlichen Ergebnisse von NEUMANN und dieser Arbeit durch eine unterschiedliche Ausgangsgröße der Explantate bedingt sind (NEUMANN: 8900 Zellen/Explantat, eigene Werte 30000-40000 Zellen/Explantat). Der Dedifferenzierungsprozeß zieht sich deshalb über einen längeren Zeitraum hin, sodaß der Anteil sehr kleiner Zellen an der Gesamtzahl gleich bleibt.

Beim Studium von Differenzierung und Morphogenese ist neben der Induktion der Organogenese auch deren Verlust von Interesse. Auf Ms wurde bei allen Kulturen ein Anstieg der Embryogenese zwischen der 4. und 12. Woche nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe beobachtet, stets gefolgt von einer Abnahme derselben. Spätestens nach ca. 60 Wochen war die Fähigkeit zur Embryobildung erloschen (ABB! 13, 14, 15). Dieser Befund kann

Tab.9: Durchschnittliches Gewicht der Zellen (μg) nach verschieden langer Kultivierung (Wochen) auf Ms und Mw.

Stamm	0	1	2	4	8	12	16	20	24	28	32	36
Ms F1	0,07	0,11	0,17	0,20	0,09	0,10	0,09	0,09	0,08	0,13	-	0,10
F2	0,09	0,08	0,13	0,20	0,04	0,06	0,05	0,04	0,05	0,03	-	0,03
F3	0,09	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,06	0,05	0,05	-	-	-
F4	0,08	0,08	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05	0,04	0,05	-	-	-
E1	-	-	-	0,06	0,06	0,04	0,04	0,05	0,04	0,03	0,06	0,05
E2	-	-	-	0,11	0,07	0,03	0,04	0,06	0,06	0,04	0,04	0,05
E3	-	-	-	0,06	-	0,03	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,06
Mw F1	0,07	0,08	0,20	0,25	0,14	0,12	-	-	-	-	-	-
F2	0,09	0,08	0,08	0,12	0,08	0,16	-	-	-	-	-	-
F3	0,09	0,07	0,09	0,08	0,12	0,10	-	-	-	-	-	-
F4	0,07	0,08	0,08	0,08	0,14	0,11	-	-	-	-	-	-
E1	-	-	-	0,05	0,06	0,03	0,04	0,09	0,06	0,05	0,06	0,06
E2	-	-	-	0,14	0,10	0,05	0,13	0,13	0,13	0,17	0,06	0,13
E3	-	-	-	0,04	0,03	0,10	0,04	0,18	0,03	0,05	0,05	0,03

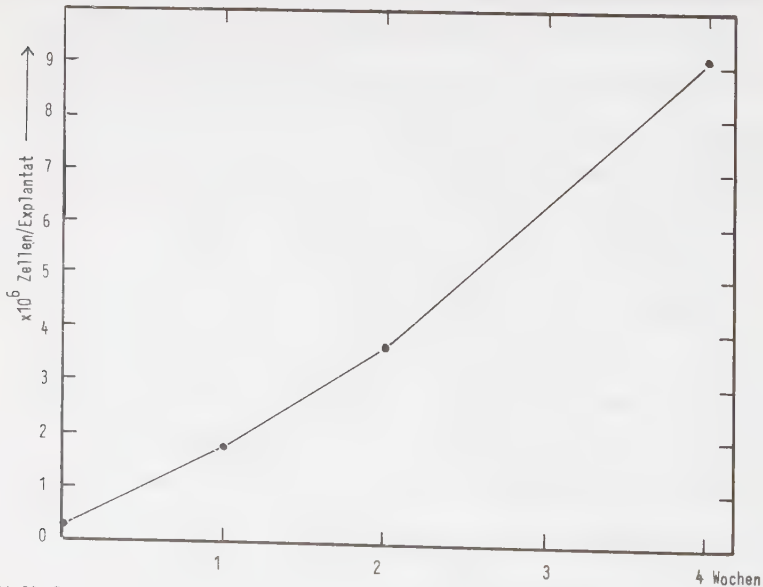


Abb.28: Zunahme der Zellzahl/Explantat bei Stamm F3 auf Ms in den ersten 4 Wochen

Abszisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe
Ordinate: Zellzahl/Explantat in Millionen

als gesichert angesehen werden, da Gleiches schon mehrfach beschrieben wurde (REINERT 1967; REINERT et al. 1968; REINERT et al. 1970). Auch HALPERIN's Kalluskulturen auf Agar zeigten im Laufe der Kultivierungsdauer keine Embryonen mehr (HALPERIN 1966b).

Die Wurzelbildung auf Mw war nicht so regelmäßig wie die Embryogenese. Wahrscheinlich benötigten die Kulturen länger als 4 Wochen, um neue Wurzelanlagen zu bilden, nachdem die alten entfernt worden waren, sodaß hohe Prozentsätze wurzelbilden- der Kulturen mit niedrigen abwechselten (Abb.20, 21). Allerdings gab es auch hier Stämme (E1-3; C1-4), die Perioden maximaler Wurzelregeneration hatten (24.-60. Woche). Wie bei REINERT et al. (1970) wurden aber auch in dieser Untersuchung Stämme gefunden, deren Mehrzahl der Explantate auch noch später Wurzelbildung zeigten.

In allen Fällen war der Verlust der Morphogenese verbunden mit einer Zunahme des Frischgewichtszuwachses (vermehrte Kallusbildung, Abb.1), Vergrößerung der Zellen (Abb.7; Tab.9) und einer Erhöhung des Wassergehaltes (Abb.4).

Der Verlust der Morphogenesefähigkeit war nicht mit dem Zeitraum seit Herauslösung der Explantate aus dem Gewebeverband der intakten Pflanze bzw. der Kultivierungsdauer korreliert. Wurden nämlich Mw-Kulturen zu einem Zeitpunkt auf Ms übertragen, in dem die Embryogenese von Ms-Kulturen (seit Isolierung aus der Rübe nur auf Ms kultiviert) schon erloschen war, so bildeten sie zunächst zu 100 % Embryonen (Abb.14; REINERT et al. 1968). Sie teilten sich in den ersten 4 Wochen nach dem Umsetzen um ein Drittel schneller als Ms-Kulturen und um $\frac{2}{3}$ schneller als Mw-Kulturen und wiesen

nach 4 Wochen sehr kleine Zellen auf; d.h. sie durchliefen nochmals eine Dedifferenzierungsphase. Beim Umsetzen zu einem späteren Zeitpunkt als 80 Wochen nahm aber auch bei ihnen der Prozentsatz embryobildender Kulturen im Durchschnitt ab und lag nach 236 Wochen noch bei ca. 40 %.

REINERT et al. (1970) nehmen an, daß die Geschwindigkeit, mit der Kulturen ihre Embryogenesefähigkeit verlieren, von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit abhängt. Danach verschwindet in den Kulturen ein unbekannter Faktor, der sie zur Embryogenese befähigt, um so schneller, je öfter sie sich teilen. Es wurde nun festgestellt, daß sich in Ms-Kulturen nach 14 durchschnittlichen Zellgenerationen (d.h. nach 32 Wochen) die Fähigkeit, Embryonen zu bilden, langsam verringert. Mw-Kulturen benötigten für diese 14 Verdopplungsphasen der Zellpopulation ungefähr 72 Wochen. Setzte man sie anschließend auf Ms-Medium, so bildeten auch sie bekanntlich nicht mehr 100 % Embryonen im Durchschnitt. Auch bei REINERT et al. (1968; 1970) erreichten Kulturen nach dem Umsetzen von Mw auf Ms nach 80 Wochen nicht mehr 100% Embryobildung. Der kritische Zeitpunkt schwankt natürlich etwas, da nicht alle Kulturen die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit haben. Um den Einfluß des langsameren Wachstums auf die längere Erhaltung der Embryobildungsfähigkeit von dem der Medienzusammensetzung abzugrenzen, erfolgte die Kultivierung auf Ms, aber bei niedrigerer Temperatur. Das Wachstum wurde dadurch ebenfalls retardiert (Abb.3,11). Bei 13°C hatten Ms-Kulturen ungefähr dieselbe Wachstumsgeschwindigkeit wie Mw-Kulturen bei 28°C (Abb.3,11) und bildeten ebenfalls keine Embryonen. Allerdings bestanden die Explantate von der

16. Woche nach Isolierung aus der Rübe an aus wesentlich kleineren Zellen als Mw-Kulturen und auch Ms-Kulturen bei 28°C (Abb.8). Dieser Befund steht eigentlich im Widerspruch zu Ergebnissen von BURSTRÖM (1956), der an Wurzelzellen mit zunehmender Temperatur abnehmende Zellstreckung beobachtete. Es scheint, daß Zellteilungen in einem Dedifferenzierungsprozeß relativ weniger durch niedrige Temperaturen gehemmt werden als Zellstreckung. Diese infolge der niedrigen Temperatur langsam wachsenden Kulturen verhielten sich nach dem Umsetzen auf Ms 28°C genauso wie die Mw-28°C-Kulturen (Abb.3, 14, 15). Auch sie bildeten nach Umsetzung nach 80 Wochen nicht mehr zu 100 % Embryonen. Bei noch langsamer wachsenden Kulturen (Ms, 5°C) war der kritische Zeitpunkt entsprechend verschoben (Abb.18), genauso wie bei noch langsamer wachsenden Mw-13°C-Kulturen (Abb.17).

Ist der Verlust der Morphogenese nun auf irreversible Veränderungen der Zelle nach einer bestimmten Anzahl von Generationen in vitro zurückzuführen? Ähnliche Verhältnisse gelten ja für tierische Gewebekulturen; dort sterben die Zellen nach ca. 50 Zellgenerationen ab oder werden in Tumorzellen transformiert (HAYFLICK et al. 1964). Die Seneszenz wie auch die Tumorisierung der Zellen geht genauso wie in vivo mit Polyploidisierung und Aneuploidisierung der Chromosomensätze einher (HUGHES 1968; MARQUARDT 1967). Auch von fast allen darauf untersuchten pflanzlichen Gewebekulturen (außer Helianthus; PARTANEN 1963) ist Polyploidie oder Aneuploidie mit zunehmender Kulturdauer berichtet worden (PARTANEN 1963). Eine Änderung des Chromosomensatzes hängt auch vom Medium ab. So wird die Polyploidisierung durch KOM (REINERT et al. 1961), Hefe und Kinetin (TORREY 1959; 1961) gefördert. Außerdem wurden in Suspension

mehr polyploide Zellen gefunden als auch auf Agar (DEMOISE and PARTANEN 1969; MITRA et al. 1960); allerdings kam HALPERIN (1966b) zu gegenteiligen Ergebnissen. Einige Hybride, wie verschiedene Tabakarten, neigen speziesbedingt zur Aneuploidie (MELCHERS 1965; MURASHIGE et al. 1967). Außerdem besitzen einige Explantate sicher schon bei der Isolierung polyploide Zellen, da bei vielen Species endomitotische Polyploidisierung zum normalen Differenzierungsmuster einiger spezialisierter Zellen gehört (GEITLER 1953). Einige Autoren führen die Abnahme der Morphogenesekapazität bei pflanzlichen Gewebekulturen auf die Zunahme an polyploiden und aneuploiden Zellen zurück (MURASHIGE et al. 1967). Möglicherweise handelt es sich bei den Tabakkulturen tatsächlich um den tierischen Zellkulturen analoge Alterungsprozesse, zumal ihre Wachstumsrate mit zunehmendem Alter abnimmt; dasselbe stellten auch NORSTOG et al. (1969) an 10-jährigen Lolium-Gewebekulturen fest. Bei Karottenkulturen veränderte sich dagegen die Wachstumsintensität nicht mehr (sowohl auf Ms als auch auf Mw), wenn erst einmal optimale Kallusentwicklung erreicht wurde (1-5 Jahre nach Isolierung der Explantate aus der Rübe). Die biochemische Bestimmung des DNS-Gehaltes/Zelle ergab, daß auf Ms die Mehrzahl der Stämme (10 von 13) ebensoviel DNS enthielt wie die Rüben im Durchschnitt besitzen (Abb.25), d.h. also wahrscheinlich diploid bleiben. Damit sind Aneuploidie und Chromosomenmutationen nicht ausgeschlossen; bei Lolium-Endosperm-Kulturen (NORSTOG et al. 1969) war zwar die Triploidie erhalten, die individuellen Chromosomen aber stark verändert. Im Gegensatz zu Ms-Kulturen war bei Mw-Kulturen die DNS-Menge/Zelle

gegenüber der Karotte ungefähr verdoppelt und lag bei 3 von 13 Stämmen sogar höher (Abb.25). Hier dürfte Polyploidie vorliegen oder es könnten für den Fall der doppelten DNS-Menge die Zellen zum Zeitpunkt der Bestimmung in der G2- oder S-Phase des Mitosezyklus liegengeblieben sein; letzteres ist nach D'AMATO (1964) und PATAU et al. (1961) grundsätzlich möglich.

Es ergab sich jedoch keine Relation zwischen DNS-Gehalt der Mw-Kulturen und dem Prozentsatz an Kulturen mit Wurzel- bzw. Embryobildung nach Umsetzen auf Ms (Abb.26; Tab.7). Das bedeutet aber, daß immer noch genügend normale, diploide Zellen vorhanden waren, die Regenerate bildeten, es sei denn, daß auch polyploide und aneuploide Zellen ihre Totipotenz nicht verloren haben. Ersteres stellten MITRA et al. (1960) bei ihren Karottenkulturen fest: nur die diploiden Zellen des mixoploiden Kallus bildeten Wurzeln. Ihre Aussage stützt sich aber nur auf wenige Einzelbeobachtungen. Nach TORREY (1967) regenerieren auch tetraploide Zellen tetraploide Wurzeln und nach SACRISTAN et al. (1969) können sogar aneuploide Zellen von normalen, habituierten bzw. crown-gall-Tabak-Kulturen wieder ganze Pflanzen ausbilden. Diese gehen entweder durch Selektion bestimmter aneuploider Zellen aus dem gemischten Kallus hervor (SACRISTAN et al. 1969) oder weisen dieselben Anomalien wie der einheitliche Ausgangskallus auf (SACRISTAN et al. 1971 bei Crepis).

Es hat sich also gezeigt, daß Polyploidie und sogar Aneuploidie kein Hinderungsgrund für morphogenetische Prozesse sein müssen, und schon gar nicht zum Tode der Zellen führen, wie bei den tierischen Gewebekulturen. Werden aber die pflanzlichen

Gewebekulturen vielleicht immer zu Tumorzellen transformiert? Die Wachstumsveränderungen der hier beschriebenen Karottenkulturen stimmen ungefähr mit denen überein, die GAUTHERET (1955) für "habituierte" Gewebekulturen nennt. Solche habituierten Kulturen wurden zunächst mit Auxin kultiviert, wuchsen nach einer gewissen Zeit aber ohne Auxin genauso gut, da die Zellen selbst Auxin produzierten. Als Nachweis ihres Tumorcharakters kann gelten, daß die Kalli nach Pfropfung auf eine gesunde Pflanze dort weiterwucherten, was bei nicht habituierten Kulturen nicht der Fall war. Bei den hier untersuchten Stämmen wurden zwar solche gefunden, die auch ohne 2,4-D gut wuchsen (z.B. C4 auf Ms), doch war diese Veränderung des Stoffwechsels nicht mit dem Verlust der Embryogenese gekoppelt; d.h. C 2 - 4 bildeten keine Embryonen mehr, aber nur C4 konnte ohne Auxin wachsen. Auch muß die Tumorisierung der Zellen keine irreversible Veränderung darstellen: SACRISTAN et al. (1969) erhielten aus habituierten und crown-gall-Tabak-Kulturen Sproßregenerate, diese waren allerdings steril. Die "echte Erholung" der Zellen, die BRAUN (1959) bei Nicotiana-crown-gall-Kalli über mehrere Pfropfungen feststellte, und die schließlich zur Regeneration einer fertilen Pflanze führte, muß angezweifelt werden, da die Sproßregeneration auch aus der Unterlage stammen könnte; außerdem enthalten Teratome auch normale Zellen, die hier selektioniert worden sein können.

Es ist also anzunehmen, daß der Verlust morphogenetischer Fähigkeiten in pflanzlichen Gewebekulturen oft reversibel ist und nicht mit dem Verlust genetischer Information verbunden sein muß. In einigen wenigen Fällen (außer den oben erwähnten Sproßregeneraten aus Tumoren und habituierten Kulturen) ist es auch gelungen, die

Morphogenese wieder in Gang zu bringen, nachdem sie erloschen war. REINERT et al. (1970) konnten in Ms-Kulturen durch 2,4-D-Entzug Embryonen zu einem Zeitpunkt induzieren, an dem die Kulturen auf vollständigem Ms-Medium dazu nicht mehr in der Lage waren. Auch STEWARD (1967) konnte durch wechselnde Zugabe und Wegnahme von Naphtylelessigsäure an älteren Karottenkulturen zumindest Sprosse und Wurzeln wieder induzieren, SYONO (1965b) durch kurze Kälteeinwirkung in einem bestimmten Alter der Kulturen ebenfalls Sprosse. Die meisten Versuche, die Morphogenese durch Zugabe der unterschiedlichsten Substanzen wieder in Gang zu bringen, hatten allerdings keinen Erfolg.

Nach den Ergebnissen, die hier für Wachstum und Embryogenese der Karottenkulturen erhalten wurden, ist der Entwicklungsablauf in diesen Kalli vielleicht folgendermaßen zu erklären:

In den erwachsenen, differenzierten Karottenzellen werden durch Wundreiz und Wirkung des Mediums Zellteilungen induziert, die schließlich zu einer vollkommenen Dedifferenzierung der Ausgangszellen führen. Dazu wird eine bestimmte Anzahl von Zellgenerationen benötigt. Die dedifferenzierten Zellen haben wieder alle ihre Potenzen zur Verfügung und können ganze Pflanzen über normale Embryonen regenerieren. Sie können sich ebenso zu Parenchymzellen strecken, erneut dedifferenzieren und dann erst Embryonen bilden. Nach längerer Einwirkung des künstlichen Milieus (Ms-Medium) reagiert die Kalluszone auf ihre neue Umwelt, indem sie spezielle Eigenschaften entwickelt. Sie behält zwar ihre Teilungsfähigkeit, kann aber keine embryogenen Zellen hervorbringen. Sie differenziert sich

also neu entsprechend ihrem veränderten Milieu und damit wird ihre Totipotenz eingeengt.

Offensichtlich durchliefen nicht alle Karottenzellen gleich zu Beginn der Kultivierung eine Dedifferenzierungsphase, sondern erst nach und nach, bis das ursprüngliche Karottengewebe nicht mehr vorhanden war. Entfernte man das Karottenstück bei genügender Kallusbildung zum frühestmöglichen Zeitpunkt und kultivierte nur den Kallus weiter, so nahm die Embryogenese früher ab, als bei Mitübertragung des ursprünglichen Karottenstückes (Abb.29). Solange noch direkt vom Karottenstück stammende Zellen zur Verfügung standen, wurden mit größerer Wahrscheinlichkeit Embryonen gebildet; nach einigen Zellgenerationen nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, da die Kalluszelle schon wieder spezialisiert ist.

Bei Explantaten auf Mw führte die Dedifferenzierungsphase nur zu teilungsfähigen Parenchymzellen, die noch nicht embryogen waren. Wurden sie auf Ms übertragen, machten sie eine erneute Dedifferenzierung durch, die der von Ms-Kulturen am Beginn der Kultivierung sehr ähnlich war. Überhaupt verhielten sich die umgesetzten Kulturen im Weiteren wie junge Ms-Kulturen. Nach der gleichen Anzahl von Generationen schienen aber auch Mw-Kulturen wie Ms-Kulturen an ihr Milieu angepaßt zu sein; verbunden damit war eine Abnahme der Wahrscheinlichkeit, daß sich Mw-Zellen nach Umsetzen auf Ms noch dedifferenzieren und Embryonen bilden konnten.

Soll die differenzierte, festgelegte Parenchymzelle (z.B. auf Ms) wieder zur Embryogenese angeregt werden, so müßte eine der Verwundung und Wuchsstoffeinwirkung auf die genuine Karottenzelle ähnliche Behandlung gefunden werden. Diese Behandlung müßte die Zelle so aus ihrer gewohnten Umgebung reißen, daß sie wieder alle ihre Potenzen mobilisiert.

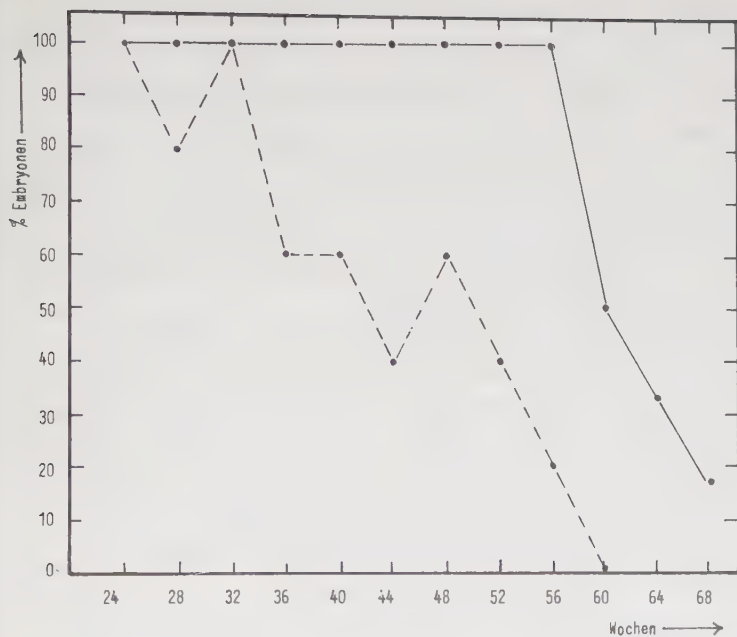


Abb. 29: Einfluß des genuinen Karottenexplantates auf die Dauer der Embryobildungsperiode.

● — ● nach jeder Subkultivierungsperiode Karottenstück möglichst ohne Kallus übertragen

● — — ● Kallus nach 24 Wochen vom Karottenstück isoliert

Abzisse: Wochen nach Isolierung der Kulturen aus der Rübe

Ordinate: % Kulturen mit Embryogenese (Mittelwerte aus 5-6 Kulturen)

ZUSAMMENFASSUNG

Karottenkulturen (Kulturform: Rote Riesen) wurden auf zwei Medien Ms und Mw von der Isolierung an über einen Zeitraum von 5 Jahren auf Wachstum, Regenerationsleistung und DNS-Gehalt untersucht.

1. Der Zuwachs an Frischgewicht war in den ersten 4 Wochen nach der Isolierung am höchsten, fiel dann in der nächsten Übertragungsperiode bei Ms und Mw auf ein Minimum ab, um nach langsamem Ansteigen auf Ms nach 44 Wochen einen konstanten Wert von 350 %, auf Mw nach 72 Wochen einen solchen von 100 % zu erreichen.
2. Im Laufe der Kultivierungsdauer nahm der Wassergehalt der Kulturen zu, bei Ms stärker als bei Mw; mit Erreichen einer konstanten Wachstumsrate blieb auch der Trockengewichtsanteil gleich mit ca. 2,5 % bei Ms- und 5,5 % bei Mw-Kulturen.
3. Die Zellzahl/Frischgewicht stieg bei Ms nach 1 Woche, spätestens aber nach 12 Wochen auf das Doppelte an. Nach 28 Wochen nahm diese Zelldichte wieder ab, und lag nach 56 Wochen unter dem Anfangswert.

Bei Mw-Kulturen war zunächst eine Abnahme der Zellzahl zu bemerken. Erst nach 24 Wochen setzte eine Zunahme ein, die auch zu einem niedrigeren Maximum führte. Nach 72 Wochen erreichten auch Mw-Kulturen konstante Zelldichten, die in etwa denen von Ms-Kulturen entsprachen.
4. Aus Frischgewichtszuwachs und Zellzahl/Frischgewicht ließ sich die durchschnittliche Zellteilungsaktivität errechnen: Zellen der 28°C-Ms-Kulturen hatten nach 32 Wochen, 28°C-Mw-Kulturen und 13°C-Ms-Kulturen erst nach 72 Wochen 14 Generationen durchlaufen.

5. Die beiden Medien Ms und Mw induzierten bei den Karottenkalli 2 verschiedene morphogenetische Prozesse: Ms-Kulturen regenerierten vollständige Embryonen, während Mw-Kulturen lediglich Wurzeln bildeten.

6a. Die Fähigkeit zur Embryogenese war außer vom Medium auch von dem Kulturalter und der Temperatur abhängig. Bei 28°C bildeten die Kulturen von der 12. bis zur 32. Woche nahezu zu 100 % Embryonen, nach 56 Wochen traten jedoch keine vollständig ausgebildeten Embryonen mehr auf. Bei niedrigeren Temperaturen (23°, 18°C) war die Embryogenese auf längere Perioden ausgedehnt (68 Wochen, > 108 Wochen), erreichte aber nur geringere Prozentsätze (90%, 20%). Bei 13°C-Kulturen traten nur globuläre Stadien auf.

b. Die Fähigkeit zur Embryobildung läßt sich durch Wachstumsretardierung in den Kulturen länger als 56 Wochen erhalten. Mw-28°- und Ms-13°C-Kulturen bildeten nach Umsetzen auf Ms 28°C solange 100% Embryonen, bis sie dieselbe Anzahl Generationen durchlaufen hatten wie Kulturen, die ab Isolierung auf Ms 28°C gewachsen waren. Noch langsamer wachsende Kulturen (Mw13°, Ms 5°C) bildeten auch noch später zu 100 % Embryonen. Die Embryogenese nahm zwar auch bei Mw-Kulturen nach der 14. Generation stetig langsam ab, wenn sie auf Ms übertragen wurden, doch konnte absolutes Erlöschen der Regenerationsfähigkeit bei den meisten Stämmen innerhalb von 228 Wochen wie bei 28°C-Ms-Kulturen nach der 26. durchschnittlichen Generation (entspricht 144 Wochen bei Mw) nicht festgestellt werden.

7a. Die Wurzelbildung auf Mw setzte erst nach 8 Wochen ein, erreichte

bei einer Kulturgruppe nach 48 Wochen ein Maximum von 80 % und fiel dann bei 2 Kulturgruppen nach 140 Wochen auf nahezu 0 %. Bei 2 anderen Kulturgruppen bildeten aber auch noch später über 50 % der Kulturen bis zu 300 Wochen Wurzeln aus.

b. Die Rhizogenese war nicht so temperaturabhängig wie die Embryogenese. Erst bei 13°C lag die Wurzelbildungsrate deutlich unter der der 18 - 28°C-Kulturen.

8. Die DNS-Menge/100 mg Trockenmasse betrug in der Karotte 30 µg. Dies entspricht $3,4 \cdot 10^{-6}$ µg DNS/Zelle. Schon in der ersten Woche der Kultivierung auf Ms stieg der DNS-Gehalt deutlich an, bis nach 3-4 Wochen die doppelte DNS-Menge/Zelle vorlag. Die Erklärung dafür liegt in der hohen Zellteilungsaktivität (sehr viele Zellen lagen in der S- und G2-Phase vor). Danach fiel der relative DNS-Gehalt bei Ms-Kulturen wieder auf der Karotte entsprechende Werte ab. Das Niveau von ca. $3 \cdot 10^{-6}$ µg DNS/Zelle blieb bei vielen Stämmen auf Ms in dem untersuchten Zeitraum bis zu 208 Wochen erhalten. Bei einigen Stämmen stieg jedoch der DNS-Gehalt/Zelle im Laufe der Kultivierungszeit zu signifikant höheren Werten an. Die Mehrzahl der Stämme auf Ms blieb also wahrscheinlich diploid. Bei Mw-Kulturen lag im Gegensatz zu Ms-Kulturen die durchschnittliche DNS-Menge auf dem doppelten Wert von $5,6 \cdot 10^{-6}$ µg DNS/Zelle, was entweder auf Tetraploidie zurückzuführen ist oder auf ein Liegenbleiben der Zellen in S oder G2.
9. Embryo- und Wurzelbildung waren von der DNS-Menge/Zelle unabhängig.

LITERATURVERZEICHNIS

- AP REES, T. and J.A. BRYANT (1971): Effects of cycloheximide on protein synthesis and respiration in disks of carrot storage tissue.
Phytochemistry 10, 1183-1190
- BACKS-HÜSEMANN, D. und J. REINERT (1970): Embryobildung durch isolierte Einzelzellen aus Gewebekulturen von *Daucus carota*.
Protoplasma 70, 49-60
- BEIER, H. (1969): Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren und Protein in Gewebekulturen von *Daucus carota*.
Diplomarbeit, FU Berlin, Pflanzenphysiol Institut
- BONNETT, H.T., Jr. and J.G. TORREY (1965): Chemical control of organ formation in root segments of *convolvulus* cultured in vitro.
Plant Physiol. 40, 1228-1236
- BORTHWICK, H.A. (1931): Development of the macrogametophyte and embryo of *Daucus carota*.
Bot. Gaz. 82, 23-44
- BRAUN, A.C. (1959): A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin.
Proc. Natl. Acad. Sci. 45, 932-938
- BROWN, R. and P.D. BROADBENT (1951): The development of cells in the growing zones of the root.
J. Exp. Bot. 1, 249-263

- BRYANT, J.A. and T. Ap REES (1971): Nucleic acid synthesis and induced respiration by disks of Carrot storage tissue. *Phytochemistry* 10, 1191-1197
- BURSTRÖM, H. (1956): Temperature and root cell elongation. *Physiol.Plant.* 9, 682-692
- BURTON, K. (1956): A study on the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Bioch.J.* 62, 315-322
- CAPLIN, S.M. (1963): Effect of the initial size on growth of plant tissue cultures. *Am.J.Bot.* 50, 91-94
- (1964): Physiological age reversal in *Daucus carota* root phloem tissue in vitro. *Am.J.Bot.* 51, 668
- D'AMATO, F. (1964): Nuclear changes and their relationships to histological differentiation. *Caryologia* 17, 317-325
- DANILINA, A.N., E.V. LUSS and R.G. BUTENKO (1965): Peculiarities of dedifferentiation of specialized carrot cells and characteristic of callus growth. *Sov.Plant Physiol.* 12, 407-414
- DEMOISE, C.F. and C.R. PARTANEN (1969): Effects of subculturing and physical condition of medium on the nuclear behavior of a plant tissue culture. *Am.J.Bot.* 56, 147-152

- DE TOROK, D. and T.H. RODERICK (1962): Associations between growth rate, mitotic frequency, and chromosome number in a plant tissue culture.
Cancer Res. 22, 174-181
- DISCHE, Z. (1955): Color reactions of nucleic acid compounds.
in: The Nucleic Acids, Vol.I, 285-305
E. CHARGRAFF and J.N. DAVIDSON (Ed.)
Acad.Press, New York
- DOERSCHUG, M.R. and C.O. MILLER (1967): Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants.
Am.J.Bot. 54, 410-413
- GAUTHERET, R.J. (1955): Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures de tissus végétaux.
Rev.gén.bot. 62, 1-110
- GAUTHERET, R.J. (1939): Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus tubercules de Carotte.
C.R.Acad.Sci. (Paris) 208, 118-120
- GAUTHERET, R.J. (1957): Histogenesis in plant tissue cultures.
J.Natl.Cancer Inst. 19, 555-573
- GAUTHERET, R.J. (1966): Factors affecting differentiation of plant tissues grown in vitro.
in: Cell Differentiation and Morphogenesis , 55-95
International Lecture Course, Wageningen, The Netherlands, April 26-29, 1965
W. Beermann, C.W. Wardlaw, R.J.Gautheret, et al.(Ed.)
North-Holland publishing company, Amsterdam
- GAUTHERET, R.J. (1969): Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured in vitro.
Am.J.Bot. 56, 702-717

- GEITLER, L. (1953): Endomitose und endomitotische Polyploidisierung.
Protoplasmatologia VIC, Wien, Springer-Verlag
- GOLDSTEIN, A. (1964): Biostatistics. An Introductory Text.
The Macmillan Company, New York
- HABERLANDT, G. (1902): Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen.
S.B.Akad.Wiss., Wien, Math.Nat.Cl. 111, 69-92
- HACCIUA, B. (1955): Experimentally induced twinning in plants.
Nature 176, 355-356
- HACCIUS, B. und K.K. LAKSHMANAN (1965): Adventivembryonen aus Nicotiana-Kallus, der bei hohen Lichtintensitäten kultiviert wurde.
Planta 65, 102-104
- HACCIUS, B. und H. REICHERT (1964): Restitutionserscheinungen an pflanzlichen Meristemen nach Röntgenbestrahlung von Eranthis hiemalis.
Planta 62, 355-372
- HALPERIN, W. (1966a): Single cells, coconut milk, and embryogenesis in vitro.
Science 153, 1287-1288
- HALPERTN, W. (1966b): Alternative morphogenetic events in cell suspension.
Am.J.Bot. 53, 443-453
- HALPERIN, W. (1969): Morphogenesis in cell cultures.
Ann.Rev.Plant Physiol. 20, 395-418
- HALPERIN, W. and D.F. WETHERELL (1965a): Ammonium requirement for embryogenesis in vitro.
Nature 205, 519-520

- HALPERIN, W. and D.F. WETHERELL (1965b): Ontogeny of adventive embryos of wild Carrot.
Science 147, 756-758
- HAYFLICK, L. and P.S. MOORHEAD (1964): The limited in vitro life-time of human diploid cell strains.
in: Cytogenetics of cells in culture, 155-173
R.J.C. HARRIS (Ed.)
Acad.Press, New York - London
- HOLDGATE, D.P. and T.W. GOODWIN (1965): Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids.
Phytochemistry 4, 831-843
- HOLTZER, H., J. ABBOTT, J. LASH and S. HOLTZER (1960): The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro.
I. Dedifferentiation of cartilage cells.
Proc.Natl.Acad.Sci. 46, 1533-1542
- HOMES, J.L.A. (1967): Influence de la concentration en glucose sur le développement et la différenciation d'embryons dans des tissus de carotte cultivés in vitro.
in: Les cultures de tissus de plantes.
Coll.Nat.N^o920 du C.N.R.S., Strasbourg, 49-60
- HUGHES, D.T. (1968): Cytogenetical polymorphism and evolution in mammalian somatic cell populations in vivo and in vitro
Nature 217, 518-523
- KATO, H. (1968): The serial observations of the adventive embryogenesis in the microculture of Carrot tissue.
Sci.Pap.Coll.Gen.Educ., Univ.Tokyo, 18, 191-198

- KATO, H. and M. TAKEUCHI (1963): Morphogenesis in vitro starting from single cells of carrot root.
Plant Cell Physiol. 4, 243-245
- KATO, H. and M. TAKEUCHI (1966): Embryogenesis from the epidermal cells of Carrot hypocotyl.
Sci.Pap.Coll.Gen.Educ., Univ.Tkkyo, 16, 245-253
- KOHLLENBACH, H.W. (1965): Über organisierte Bildungen aus *Macleaya cordata* Kallus.
Planta 64, 37-40
- KONAR, R.N. and K. NATARAJA (1965): Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from stem epidermis.
Phytomorphology 15, 132-137
- KUPILA, S., A.M. BRYAN and H. STERN (1961): Extractability of DNA and its determination in tissues of higher plants.
Plant physiol. 36, 212-215
- LEVINE, M. (1947): Differentiation of Carrot root tissue grown in vitro.
Bull.Torrey bot.Club 74, 321-328
- LINSER, H. und K.H. NEUMANN (1968): Untersuchungen über Beziehungen zwischen Zellteilung und Morphogenese bei Gewebekulturen von *Daucus carota*. 1. Rhizogenese und Ausbildung ganzer Pflanzen.
Physiol.Plant. 21, 487-499
- LIPETZ, J. (1962): Calcium and the control of lignification in tissue cultures.
Am.J.Bot. 49, 460-464

- MACDONALD, I.R., A.H. KNIGHT and P.C. DE KOCK (1961): Metabolic processes associated with growth in storage tissue disks.
Physiol.Plant. 14, 7-19
- MARQUARDT, H. (1967): Neuere Ergebnisse der somatischen Genetik.
Naturwiss. 54, 217-222
- MATHES, M.C., M. MORSELLI and J.W. MARVIN (1971): The in vitro growth and metabolism of *Acer saccharum* tissue.
Can.J.Bot. 49, 495-500
- MATTHYSSE, A.G. and J.G. TORREY (1967): DNA synthesis in relation to polyploid mitosis in excised pea root segments cultured in vitro.
Exp.Cell Res. 48, 484-498
- MELCHERS, G. (1965): Einige genetische Gesichtspunkte zu sogenannten Gewebekulturen.
Ber.d.dt.bot.Ges. 78, (21)-(29)
- MELCHERS, G. und L. BERGMANN (1958): Untersuchungen an Kulturen von haploiden Geweben von *Antirrhinum majus*.
Ber. d. dt. bot. Ges. 71, 495-473
- MITRA, J., M.O. MAPES and F.C. STEWARD (1960): Growth and organized development of cultured cells.
IV. The behavior of the nucleus.
Am.J.Bot. 47, 357-368
- MURASHIGE, T. and R.T. NAKANO (1965): Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence.
Am.J.Bot. 52, 819-827

- MURASHIGE, T. and R.T. NAKANO (1967): Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells.
Am.J.Bot. 54, 963-970
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiol.Plant. 15, 473-497
- NEUMANN, K.H. (1965): Wurzelbildung und Nukleinsäuregehalt bei Phloem-Gewebekulturen der Karottenwurzel auf synthetischem Nährmedium verschiedener Hormonkombinationen.
in: Les Congres et Colloques de l'université de Liège. Vol. 38, 95-102
Les Phytohormones et l'organogenèse
- NEUMANN, K.H. (1969): Mikroskopische Untersuchungen zum Wachstumsverlauf von Explantaten verschiedener Gewebepartien der Karottenwurzel in Gewebekultur.
Mikroskopie 25, 261-271
- NEUMANN, K.H. and F.C. STEWARD (1968): Investigations on the growth and metabolism of cultured explants of *Daucus carota*:
I. Effects of iron, molybdenum and manganese on growth.
Planta 81, 333-350
- NITSCH, J.P. (1969): Experimental androgenesis in *Nicotiana*.
Phytomorphology 19, 389-404
- NOBECOURT, P. (1938): Sur les proliferations spontanées de fragments de tubercules de Carotte et leur culture sur milieu synthétique.
Bull.Soc.Bot.France 85, 1-7

- NORREEL, B. et J.-P. NITSCH (1968): La formation d' "embryons végétatifs" chez *Daucus carota* L.
Bull.Soc.bot.Fr. 115, 501-514
- NORSTOG, K., W.E. WALL and G.P. HOWLAND (1969): Cytological characteristics of ten-year-old rye-grass endosperm tissue cultures.
Bot.Gaz. 130, 83-86
- PAECH, K. (1957): Carotinoidbildung und Stickstoffumsatz.
Planta 48, 587-591
- PÄTAU, K. (1943): Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen.
Biol.Zbl. 63, 152-168
- PARTANEN, C.R. (1963): Plant tissue culture in relation to developmental cytology.
Int.Rev.Cytol. 15, 215-243
- PATAU, K. and N.K. DAS (1961): The relation of DNA synthesis and mitosis in tobacco pith tissue cultured in vitro.
Chromosoma 11, 553-572
- REINERT, J. (1958a): Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen.
Ber.dt.bot.Ges. 71, (15)
- REINERT, J. (1958b): Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten.
Naturwiss. 45, 344-345
- REINERT, J. (1959): Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten.
Planta 53, 318-333

- REINERT, J. (1965): Neue Ergebnisse und Probleme mit Gewebekulturen aus höheren Pflanzen.
Ber.d.t.bot.Ges. 78, (1)-(11)
- REINERT, J. (1967): Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucus carota*.
Phytomorphology 17, 510-515
- REINERT, J. (1968): Morphogenese in Gewebe- und Zellkulturen.
Naturwiss. 55, 170-175
- REINERT, J. and D. BACKS (1968): Control of totipotency in plant cells growing in vitro.
Nature 220, 1340-1341
- REINERT, J. und D. BACKS-HÜSEMANN (1969): Gewebekulturen aus Einzelzellen höherer Pflanzen auf synthetischem Medium.
Naturwiss. 56, 570-571
- REINERT, J., D. BACKS und M. KROSING (1969): Faktoren der Embryogenese in Gewebekulturen aus Kulturformen von Umbelliferen.
Planta 68, 375-378
- REINERT, J., D. BACKS-HÜSEMANN and H. ZERBAN (1970): Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*.
in: Les cultures de tissus de plantes, 261-268
Coll.Internat. N°193 du C.N.R.S., Strasbourg 1970
- REINERT, J. und M. TAZAWA (1969): Wirkung von Stickstoffverbindungen und von Auxin auf die Embryogenese in Gewebekulturen.
Planta 87, 239-248

- REINERT, J., M. TAZAWA and S. SEMENOFF (1967): Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro.
Nature 216, 1215-1216
- REINERT, J. and J.G. TORREY (1961): Über die Kultur von Geweben aus Haplopappus gracilis.
Naturwiss. 48, 132-133
- SACRISTAN, M.D. and G. MELCHERS (1969): The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco.
Molec.Gen.Genetics 105, 317-330
- SACRISTAN, M.D. and M.F. WENDT- GALLITELLI (1971): Transformation to auxin-autotrophy and its reversibility in a mutant line of Crepis capillaris callus culture.
Molec.Gen.Genetics 110, 355-360
- SCHNEIDER, W. (1945): Phosphorous compounds in animal tissues. Extraction and estimation of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and pentose nucleic acid.
J.Biol.Chem. 161, 293-303
- SHORT, K.G., E.G. BROWN, and H.E. STREET (1969): Studies on the growth in culture of Acer pseudoplatanus L. cell suspensions.
J.Exp.Bot. 20, 579-590
- SKOOG, F. (1944): Growth and organ formation in tobacco tissue cultures.
Am.J.Bot. 31, 19-24
- SKOOG, F. and C.O. MILLER (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro.
Symp.Soc.Exp.Biol. 11, 118-131

- SMILLIE , R.M. and G. KROTKOV (1960): The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants.
Can.J.Bot. 38, 31-49
- STANGE, L. (1965): Plant cell differentiation.
Ann.Rev.Plant Physiol. 16, 119-140
- STEELE, W.J., N. OKAMURA, and H. BUSCH (1964): Prevention of loss of RNA, DNA and protein into lipid solvents.
Biochim.Biophys.Acta 87; 490-492
- STEWART , F.C. (1967): Totipotency of angiosperm cells. Its significance for morphology and embryology.
Phytomorphology 17, 469-507
- STEWART, F.C., M.O. MAPES and A.E. KENT (1963): Carrot plants from cultured cells: new evidence for the totipotency of somatic cells.
Am.J.Bot. 50, 618
- STEWART, F.C., M.O. MAPES, A.E. KENT, and R.D. HOLSTEN (1964): Growth and development of cultured plant cells. Biochemical and morphogenetic studies with cells yield new new evidence on their metabolism and totipotency.
Science 143, 20-26
- STEWART, F.C., M.O. MAPES, and K. MEARS (1958): Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells.
Am.J.Bot. 45, 705-708
- STEWART, F.C. and H.Y. MOHAN RAM (1961): Determining factors in cell growth: some implications for morphogenesis in plants.
Advances in Morphogenesis I, 189-265

- STREET, H.E. (1966): The nutrition and metabolism of plant tissue
and organ cultures.
In: Cells and tissues in culture, Vol 3, S. 534-629
E. WILLMER (Ed.)
Acad. Press, London - New York, 1966
- STREET, H.E. (1967): The induction of cell division in plant
suspension cultures.
In: Les cultures de tissus de plantes.
Coll.Nat.No.920 du C.N.R.S., Strasbourg, S. 177-193
- STREET, H.E. and G.G. HENSHAW (1966): Introduction and methods
employed in plant tissue culture.
In: Cells and tissues in culture, Vol.3, S. 459-532
E. WILLMER (Ed.)
Acad. Press, London - New York, 1966
- SYONO, K. (1965a): Physiological and biochemical changes of carrot
root callus during successive cultures.
Plant Cell Physiol. 6, 371-392
- SYONO, K. (1965b): Changes in organ forming capacity of carrot
root calluses during subcultures.
Plant Cell Physiol. 6, 403-419
- TAZAWA, M. and J. REINERT (1969): Extracellular and intracellular
chemical environments in relation to embryogenesis
in vitro.
Protoplasma 68, 157-173
- TORREY, J.G. (1959): Experimental modification of development
in the root.
In: Cell, Organism and Milieu, S. 198-222
D. RUDNICK (Ed.), Ronald Press, New York
17th Symp. Soc. Study Dev. Growth

- TORREY, J.G. (1961): Kinetin as trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells.
Esp.Cell Res. 23, 281-299
- TORREY, J.G. (1967): Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures.
Physiol.Plant. 20, 265-275
- VASIL, I.K. and A.C. HILDEBRANDT (1966): Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. II. *Petroselinum hortense*.
Am.J.Bot. 53, 869-874
- WETHERELL, D.F. and W. HALPERIN (1963): Embryos derived from callus tissue cultures of the wild carrot.
Nature 200, 1336-1337
- WHITE, P.R. (1939a): Potentially unlimited growth of excised plant callus in artificial nutrient.
Am.J.Bot. 26, 59-64
- WHITE, P.R. (1939b): Controlled differentiation in a plant tissue culture.
Bull.Torrey bot. Club 66, 507-513
- WHITE, P.R. (1954): The cultivation of animal and plant cells.
Ronald Press, New York
- WILDES, R.A. and T.F. NEALES (1971): Maintenance of viability of carrot tissue slices in washing solutions after cutting.
Aust.J.biol.Sci. 24, 397-402
- WOODSTOCK, L.W. and F. SKOOG (1960): Relationships between growth rates and nucleic acid contents in the roots of inbred lines of corn.
Am.J.Bot. 47, 713-716

- YAMADA, T., H. NAKAGAWA and Y. SINÔTO (1967): Studies on the differentiation in cultured cells. I. Embryogenesis in three strains of solanum callus.
Bot.Mag.Tokyo 80, 68-74
- YAMADA, Y. and T. YASUDA (1971): Changes in the basicity of histone fraction during callus induction.
Bioch.Biophys.Res.Comm. 43, 488-493
- YEOMAN, M.M., A.F. DYER, and A.J. ROBERTSON (1965): Growth and differentiation in plant tissue cultures. I. Changes accompanying the growth of explants from Helianthus tuberosus tubers.
Ann. Bot. 29, 265-276
- YEOMAN, M.M., P.K. EVANS and G.G. NAIK (1966): Changes in mitotic activity during early callus development.
Nature 209, 1115-1116
- YEOMAN, M.M., G.G. NAIK, and A.J. ROBERTSON (1968): Growth and differentiation of plant tissue cultures.
III. The initiation and pattern of cell division in developing callus cultures.
Ann. Bot. 32, 301-313

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1969 bis Januar 1972 in der WE Botanik II (Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie) des Fachbereiches 23 (Biologie) der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J. Reinert möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und einiger älterer Stämme von Karottenkulturen sowie für sein Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

LEBENS LAUF

Am 17.5.1942 wurde ich als erstes Kind des Dipl.Ing. Hans Teuter und seiner Ehefrau Käthe, geb. Bolz, in Augsburg geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Pestalozzi-Schule in Wiesbaden-Biebrich, anschließend die Helene-Lange-Schule, Gymnasium für Mädchen, in Wiesbaden. Am 27.2.1962 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1962 begann ich mein Studium an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz mit den Fächern Biologie, Mathematik und ev. Theologie. Im WS 1964/65 setzte ich mein Studium an der Ruprecht-Karl-Universität in Heidelberg fort; dort legte ich auch im Mai 1965 den allgemeinen Teil der 1. wissenschaftlichen Staatsprüfung für das Amt des Studienrates ab. Zum WS 1965/66 wechselte ich zur Freien Universität Berlin über. Im September 1966 wurde ich als wissenschaftliche Hilfsassistentin am Pflanzenphysiologischen Institut eingestellt. Dort erhielt ich auch Thema und Arbeitsplatz für meine experimentelle Staatsexamensarbeit. Die erste wissenschaftliche Staatsprüfung legte ich dann in Biologie und Mathematik am 15.11.1968 ab.

Im Januar 1969 begann ich mit meiner Doktorarbeit im Pflanzenphysiologischen Institut; außerdem war ich als wissenschaftliche Hilfsassistentin und ab 1.10.1969 als wissenschaftliche Assistentin am Institut tätig.

